

НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ПРИКЛАДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Методические указания по выполнению самостоятельной и контрольной
работ

\

Новосибирск 2022

УДК 577.21+ 612.6.05 + 575.1
ББК 58
С28

Кафедра ветеринарной генетики и биотехнологии

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

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

Прикладная биотехнология: метод. указания по выполнению самост. и контр. работ/ сост. Себежко О.И.; Новосиб. гос. аграр. ун-т. Биолого-технолог. фак-т.– Новосибирск, 2022. –110 с.

Методические рекомендации предназначены для студентов-магистров Биолого-технологического факультета, обучающихся по направлению подготовки 06.04.01 «Биология», программа «Биологические ресурсы и экология».

Изложены основные вопросы курса «Прикладная биотехнология», для самостоятельного изучения и вопросы для контрольной работы. Приведены глоссарий, библиографический список, тесты и вопросы для контроля.

Методические указания утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом БТФ (протокол № 7 от 29.09.2022 г.).

Введение

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

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

Дисциплина относится к вариативной части профессионального цикла. Общая трудоёмкость дисциплины составляет 4 зачётные единицы (144 ч). Итоговая форма контроля - зачёт с оценкой. В ходе изучения дисциплины студенты выполняют контрольную работу. На самостоятельную работу отводится 102 ч., в том числе на подготовку к зачёту 12 ч.

Знания по дисциплине "Прикладная биотехнология" базируются на знаниях генетики и эволюции, современной экологии и глобальных экологических проблем, биохимии, биофизики, иммунологии, биологии клетки, цитологии, молекулярной биологии; базирующиеся дисциплины: качество и безопасность пищи, проблемы интенсификации сельского хозяйства.

Требования к первоначальному уровню подготовки обучающихся:

- 1.Фундаментальные положения генетики и биометрии.
- 2.Основы биотехнологии.
- 3.Принципиальные положения молекулярной генетики и биологии.
- 4 Фундаментальную подготовку по теоретическим разделам химии, биологии и процессов и аппаратов химической и биохимической технологии.
- 5.Функциональное строение генома.

Целью методических указаний по изучению курса «Прикладная биотехнология» является обеспечение эффективности самостоятельной работы студентов на основе усвоения материала курса лекций, выполнения лабораторных работ, подготовки контрольных работ и работы с литературой.

Задачи настоящих методических указаний по изучению дисциплины включают:

- активизацию самостоятельной работы студентов;
- содействие развитию творческого отношения студентов к учебе;
- выработку умений и навыков рациональной работы с литературой;

- обеспечение контроля за ходом самостоятельной работы студентов и ее результатами;
- управление познавательной деятельностью студентов.

Задача курса учебной дисциплины «Прикладная биотехнология» – дать знания о новейших достижениях, направлениях исследования и практической реализации биотехнологической науки XXI века и обеспечить формирование у студентов представлений о революционных изменениях в области генетической инженерии, геномики и протеомики, новейших достижений молекулярной биотехнологии.

В результате изучения дисциплины студенты приобретают знания и умения в методологии и компетенций современной биотехнологии, новейших технологиях получения и использования генетически модифицированных организмов и продуктов, базирующихся на достижениях молекулярной биологии и молекулярной биотехнологии, новейших методах геномной диагностики и терапии, клеточных технологий, способах получения новых материалов, современных аналитических методах, применяемых в биотехнологии, и основах биоинженерии. Данный курс разработан таким образом, чтобы студент на базе имеющихся знаний сформировал современное представление о потенциале и перспективах использования разнообразных биологических объектов, возможностях, путях и способах их применения для высокого жизнеобеспечения человека, отвечающего уровню современного научно-технического прогресса.

Структура и трудоемкость дисциплины

«Прикладная биотехнология»

Курс «Прикладная биотехнология» изучается в течение одного семестра (10-й) на первом курсе магистратуры. Объем дисциплины и виды учебной работы по курсу приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Вид занятий	Объем занятий [зачетных ед./часов]	Семестр
	очная	
Общая трудоемкость по учебному плану	4/144	3
В том числе,		
Аудиторные занятия	44	
Лекции	14	
Лабораторные занятия /	30	
Самостоятельная работа, всего	102	
В том числе:		
Курсовой проект (курсовая работа)		
Контрольная работа / реферат	12	3
Форма контроля		
Зачет с оценкой	12	3

Объем дисциплины и виды учебной работы

Учебной программой дисциплины «Современные проблемы и методы биотехнологии» предусмотрено 70,8 % объема времени отводить на самостоятельную работу студентов. Данный вид работы является обязательным.

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

Структура самостоятельной работы по дисциплине «Современные проблемы и методы биотехнологии»

Самостоятельная работа по курсу «Прикладная биотехнология» включает:

- самостоятельное изучение теоретического материала с использованием рекомендуемой литературы ;
- подготовку к выполнению и защите лабораторных работ;
- подготовку к практическим занятиям;

- написание и защиту контрольной работы;
- самотестирование.

По каждому виду работы студент 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.

Разделы дисциплины и виды занятий в часах (тематический план занятий), в том числе и отводимых на самостоятельное изучение курса «Прикладная биотехнология», представлены в табл. 1.2.

Таблица 1.2

Разделы дисциплины и виды занятий в часах (тематический план занятий)
курса «Прикладная биотехнология»

№ п/п	Наименование разделов и тем	Количество часов			
		Лекции (Л)	Вид занятия (ЛР, ПЗ)	Самостоятель- ная работа (СР)	Всего по теме
1	2	3	4	5	6
1	<i>Предмет прикладной биотехнологии.</i>				
1.1	Основн. направления и методы биотехнол. Современн. состояние и перспективы развития биотехнологии.	2		4	6
2	<i>Современные проблемы и методы биотехнологии.</i>				
2.1	Биотехнология, генетич. и клеточная инженерия.		4	4	6
2.2	Биотехнология и новейшие генетические методы диагностики. Генетическое и физическое картирование генома.		2	4	6
3	<i>Промышленная и экологическая биотехнология.</i>				
3.1	Биообъект. Промышленные биотехнологии.	2	4	4	6
3.2	Биотехнологические процессы очистки воздуха и воды.	2		4	6
4	<i>Современные достижения биотехнологии в сельском хозяйстве.</i>				
4.1	Микробиологическое производство антибиотиков, витаминов, премиксов кормового	2		4	6

№	Наименование разделов	Количество часов			
	назначения.				
4.2	Биотехнолог. методы в растениеводстве.	2		4	6
4.3	Препараты на основе живых культур микроорганизмов. Применение в животноводстве.		2	4	6
5.	<i>Биотехнологические методы консолидации и размножения генотипов выдающихся животных.</i>				
5.1.	Биотехнология в воспроизводстве животных.	2		4	6
5.2	Молекулярно-генетические маркёры. MAS-селекция		4	4	8
5.3	Трансгенные животные в сельском хозяйстве.	2		4	6
6.	Пищевая биотехнология.				
6.1	Продукция микро-биологического синтеза для пищевой промышленности	-	2	4	6
6.2	Генетически модифицированные источники питания.	-	4	2	6
7.	Медицинская биотехнология.				
7.1	Основные задачи биотехнологии в медицине.	2	-	4	6
7.2	Получение видоспецифических для человека препаратов.	-		6	6
7.3.	Иммунобиотехнология. Моноклональные АТ. Прививочные препараты.	-	2	4	6
8	Иммобилизованные биообъекты в биотехнологиях.				
8.1.	Способы иммобилизации биообъектов в биотехнологии. Иммобилизованные биообъекты как лекарственные средства	2	2	8	12
9.	Санитарная и профилактическая биотехнология.				
9.1	Использование, биотестов, био-	2		6	8

№	Наименование разделов	Количество часов			
	сенсоров и диагностических систем для контроля за воздухом и санитарным состоянием водных стоков.				
	<i>Подготовка к зачёту</i>			12	
	Итого	14	30	102	144

Основные принципы изучения курса «Прикладная биотехнология» с помощью учебно-методического комплекса включают следующее:

1. Студент изучает теоретический материал курса, используя конспект лекций и список рекомендуемой литературы.

2. После изучения нескольких разделов теоретического курса студент готовит контрольную работу с учетом настоящих методических рекомендаций и осваивает самостоятельно дополнительные теоретические темы согласно разработанной программе дисциплины.

3. Освоение теоретического курса сопровождается выполнением студентами лабораторных работ, для которых в рамках настоящей дисциплины разработаны специальные методические указания. В лабораторных работах эксперименты выполняются посредством применения приборов, установок и биологических агентов, способных обеспечить приобретение практических навыков и закрепить полученные теоретические знания. Для этого каждому лабораторному заданию предшествует специальный раздел – теоретическое введение, объясняющее значимость и методологию поставленных задач. После выполнения и оформления каждой лабораторной работы в конце темы приведены контрольные вопросы для закрепления приобретаемых навыков и умений.

4. Освоение теоретического курса сопровождается изучением материала практических занятий.

5. Для выявления пробелов в знаниях у студентов в ходе освоения теоретического материала по каждому теоретическому разделу дисциплины «Прикладная биотехнология» следует использовать тесты, которые разработаны для каждой главы курса и позволяют оценить степень усвоения теоретического материала студентами.

Порядок аттестации студентов по дисциплине

Семестр завершается зачётом с оценкой по дисциплине.

Для сдачи зачёта студенты должны усвоить материал лекционного курса, практических занятий и дополнительные теоретические темы дисциплины,

предназначенные для самостоятельного изучения. После изучения теоретического материала они должны успешно пройти все тесты по изучаемым темам, выполнить на положительную оценку лабораторные работы и задания, оформить и защитить контрольную работу.

Контроль знаний, умений и навыков студентов осуществляется в следующих формах. Входящий контроль проводится с целью установления остаточных знаний по базовым дисциплинам в виде тестирования на первом практическом занятии. Текущий контроль осуществляется по балльно-рейтинговой системе оценки знаний. Промежуточный контроль проводится с использованием контрольной работы с отчётом (защитой). Итоговый контроль проводится с целью установления остаточных знаний по дисциплине в виде зачёта с оценкой, который проводится в устной форме.

Условия и критерии выставления оценок по дисциплине "Прикладная биотехнология".

Для успешного получения знаний и умений по дисциплине "Прикладная биотехнология" необходимо посещение лекций и лабораторных занятий, обязательное участие в аттестационных испытаниях. Особо ценится активная работа на лабораторных занятиях, а также качество выполняемой самостоятельной работы. Для успешной работы в течение семестра магистр должен работать с предлагаемой литературой, активно участвовать в обсуждении материала, уметь излагать основные положения изученных источников литературы.

Балльная структура оценки

Исходные данные по дисциплине: количество зачетных единиц – 4, лекций – 16 часов, лабораторно-практических – 26 часов, самостоятельная работа – 51 час, всего 144 часа.

Посещение лекций, лабораторных-практических занятий- 1 балл за одно занятие ($21 \times 1 = 21$ балл)

Активная работа на практических занятиях – 21 балл.

Контрольная работа - до 13 баллов.

Выполнение тестовых заданий – до 30 баллов

Творческая работа (эссе или презентация) – 19 баллов

Зачёт – до 40 баллов

Всего – 144 балла

Бонус: научные сообщения на конференциях, научных семинарах - до 15 баллов.

Шкала оценок:

A (5+) - более 95 % от общей суммы баллов;

B (5) - 91-95 %;

C (4) - 81-95 %;

D (3+) - 71-80%;

E (3) - 61-70%;

FX (2+) - 51-60%;

F(2) - 50 и менее %.

Пояснение оценок:

A- выдающийся ответ.

B- очень хороший ответ.

C - хороший ответ.

D - достаточно удовлетворительный ответ

E - отвечает минимальным требованиям удовлетворительного ответа

FX - бакалавр может добрать баллы только до минимального удовлетворительного ответа.

F - неудовлетворительный ответ (либо повтор курса в установленном порядке, либо основание для отчисления).

Магистрам, набравшим более 101 балла (более 70%), итоговая оценка выставляется без сдачи зачёта в соответствии с вышеуказанной шкалой.

Студенты, набравшие менее 101 балла и получившие допуск к зачёту, сдают зачёт в классической форме, готовятся к нему, используя список контрольных вопросов.

Методика реализации самостоятельной работы по изучению теоретического курса

Изучение теоретического материала проводится по лекциям, прослушанным студентами в аудитории, а также представленным в электронном виде в соответствии с программой дисциплины.

Раздел 1.Предмет прикладной биотехнологии.

Тема 1.*Основные направления и методы биотехнологии. Современное состояние и перспективы развития биотехнологии (2 ч).*

Содержание темы:

- Биотехнология на рубеже XX–XXI веков.
- Новейшие достижения в области биотехнологии, трансгенные организмы и продукты, геномика и протеомика, медицинская биотехнология, новые биоматериалы.
- Биотехнология – основа научно-технического прогресса и повышения качества жизни человека в условиях возрастающей антропогенной нагрузки.
- Особенности развития исследований и коммерциализации биологических технологий в США, Японии, странах ЕС и России.
- Характеристика различных видов биотехнологической продукции (мировой объем производства в натуральном и денежном выражении) и ее основные потребители.

Для инновационного развития современной экономики ключевыми являются три направления развития технологий: информационные технологии, нанотехнологии и биотехнологии.

Тенденция к замене химических продуктов биологическими формировалась 30-40 лет назад. По оценкам, мировой рынок биотехнологий в 2025 г. достигнет уровня в 2 триллиона долларов, темпы роста по отдельным сегментам рынка колеблются от 5-7 до 30 процентов ежегодно.

Потребителями продукции биотехнологии являются преимущественно высокоразвитые страны: США, Канада, Япония и Европа. Однако в течение текущего десятилетия в технологическую гонку включились и развивающиеся страны: Китай, Индия, Бразилия реализуют масштабные программы развития по всему спектру биотехнологий.

Важность биотехнологий для развития российской экономики трудно переоценить. Модернизация технологической базы современного промышленного производства невозможна без массового внедрения биотехнологий и биотехнологических продуктов. Более того, для целого ряда отраслей (агропищевой сектор, лесной сектор, ряд подотраслей химической и нефтехимической промышленности, фармацевтической отрасли и биомедицинского сектора здравоохранения) модернизация и будет означать переход на биотехнологические методы и продукты.

В силу экономических и экологических преимуществ доля химической продукции, производимой на базе возобновляемого сырья, будет расти и дальше, достигнув в области химии – 15-20%, а в области моторных топлив – 5-7% от мирового объема производства к 2025 г. Методы биотехнологии позволяют полностью переработать отходы агропромышленного комплекса,

и в ряде стран само понятие «отходы» для этого сектора уже перестает существовать. Значительный потенциал для развития биоэнергетики может быть реализован за счет использования отходов лесопромышленного комплекса.

Биоиндустрия в мире развивается высокими темпами, и через 10-15 лет будут найдены решения и продукты, пригодные для массового и повсеместного внедрения. В последние годы достаточно активно развивается биоэнергетика, а именно получение электрической и тепловой энергии из биомассы (прежде всего из отходов лесопромышленного комплекса).

Современное состояние биоиндустрии в мире таково, что многие технологии и продукты носят экспериментальный характер, применение биопрепаратов сложнее, чем применение традиционных химических продуктов, а их стоимость выше.

В последние годы в России задействован ряд инструментов поддержки развития биотехнологий. С целью выработки долгосрочной государственной стратегии в сфере биотехнологий в последнее время был принят ряд важных решений: утверждены Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года («ФАРМА-2020»), Стратегия развития лесного комплекса Российской Федерации до 2020 года, Стратегия развития медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и принята соответствующая ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Таким образом, появились перспективы для улучшения ситуации в лесном секторе, в фармацевтической отрасли и медицинской промышленности.

Отдельные аспекты фундаментальной и промышленной биотехнологии разрабатываются в рамках ряда программ, финансируемых государством. Сформированы и решением Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям включены в Перечень технологических платформ три технологические платформы биотехнологической направленности: «Медицина будущего», «Биоиндустрия и Биоресурсы – БИОТЕХ 2030», «Биоэнергетика».

Государственная координационная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на 2011–2020 годы – Программа «БИО-2020» призвана: заложить системные основы развития биоэкономики в России; обеспечить создание новых подотраслей промышленности, нацеленных на выпуск инновационных биотехнологических продуктов для химической и нефтехимической промышленности, лесопереработки; стимулировать развитие производства в агропищевом секторе; создать базу для

индустриального развития биоэнергетики; дополнить существующую систему мер поддержки медицины и фармацевтики. Долгосрочной целью реализации Программы является выход в 2020 году на объем биоэкономики в России в размере около 1% ВВП и в 2030 году - не менее 3% ВВП.

Вопросы для самоподготовки:

1. Характеристика различных видов биотехнологической продукции (мировой объем производства в натуральном и денежном выражении) и ее основные потребители.

2. Основные биообъекты биотехнологии: микроорганизмы, клетки и ткани растений, животных и человека, биокатализаторы.

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

Раздел 2. Современные проблемы и методы биотехнологии.

Тема 2.1. Биотехнология, генетическая и клеточная инженерия.

Содержание темы:

- Общие принципы конструирования новых организмов для биотехнологии. Технологии рекомбинантных ДНК.

- Клонирование известных и конструирование новых белков.

- Общая схема векторов для клонирования и экспрессии рекомбинантных ДНК.

- Получение трансгенных организмов, не содержащих маркерные гены.

- Новые методы селекции – сочетание молекулярных и традиционных методов.

- Конструирование секретирующих организмов.

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

- Генная терапия

Генетическая инженерия – ветвь молекулярной генетики, исследующая возможности и способы создания лабораторным путем (*in vitro*) генетических структур и наследственно измененных организмов, то есть создания искусственных генетических программ, с помощью которых направленно

конструируются молекулярные генетические системы вне организма с последующим их введением в живой организм.

In vitro соединяют фрагменты ДНК, которые в естественных условиях не сочетаются благодаря межвидовым барьерам (рекомбинантные ДНК).

Согласно определению национальных институтов здоровья США, «рекомбинантными ДНК называют молекулы ДНК, полученные вне живой клетки путем соединения природных или синтетических фрагментов ДНК с молекулами, способными реплицироваться в клетке».

Молекула рекомбинантной ДНК представляет собой соединенные вне клетки два компонента: вектор, обеспечивающий механизм репликации и экспрессии, и фрагмент клонируемой (чужеродной) ДНК, содержащие интересные исследователя генетические элементы.

К наиболее важным методам биотехнологии рекомбинантных ДНК относят следующие:

1) специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, что ускоряет выделение различных генов и манипуляции с ними;

2) быстрое секвенирование (установление последовательностей азотистых оснований в ДНК) всех нуклеотидов в очищенном фрагменте ДНК, позволяющее определить точные границы гена и кодируемую им аминокислотную последовательность полипептида;

3) гибридизацию нуклеиновых кислот, позволяющую с большой точностью выявить специфические нуклеотидные последовательности на основе их способности связывать комплементарные основания;

4) клонирование ДНК, суть которого сводится к введению ДНК-фрагмента в самореплицирующийся генетический аппарат (плазмиду или вирус), который используют для трансформации бактерий. Бактериальная клетка после трансформации способна воспроизводить этот фрагмент во многих миллионах идентичных копий;

5) генетическую инженерию, позволяющую получать модифицированные версии генов и затем внедрять их в клетки или организмы.

Сущность генетической инженерии сводится к целенаправленному конструированию генетических систем вне организма и последующему введению их в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и, кроме того, они приносят в него новые генетические и физико-биотехнологические свойства.

Один из важных этапов конструирования молекулы ДНК – лигирование (или сшивание) генов с помощью фрагмента ДНК – лигазы. Сшивание

фрагментов ДНК, содержащих нужные гены, осуществляют двумя основными методами:

- а) по «липким» концам;
- б) с помощью искусственно достроенных «липких» концов (ферментативным путем). «Липкие» концы – взаимнокомплементарные участки, длиной из 4...6 пар нуклеотидов.

После того, как рекомбинантная ДНК сшита, ее вводят в живые клетки. Но поскольку она не способна к самовоспроизведению, ее разрушают внутриклеточные нуклеазы. Для того, чтобы рекомбинантная ДНК стала составной частью генетического аппарата клетки, она должна либо встроиться (интегрироваться) в ее геном и реплицироваться за его счет, либо быть способной к автономной репликации. Молекулы ДНК, способные акцептировать чужеродную ДНК и автономно реплицироваться, называют векторными молекулами. К числу векторов относят плазмиды, бактериофаги, вирусы животных. Векторы должны обладать следующими особенностями:

- 1) иметь субстратные участки для определенных эндонуклеаз рестрикции;
- 2) иметь свойства репликона;
- 3) содержать один или несколько маркерных генов, которые после проникновения вектора в клетку придают ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора.

В частности, для бактериальных векторов в качестве маркерных генов чаще всего используются гены, вызывающие устойчивость клеток к некоторым антибиотикам.

Таким образом, все векторы обеспечивают репликацию встроенных генов, их экспрессию, интеграцию в хромосому клетки и т.д.

Чаще других в генетической инженерии в качестве векторов используют плазмиды.

Первый плазмидный вектор был получен С. Коэном (1973 г). Его источником была плазида *E.coli* R₆₋₅ с молекулярной массой 65 кДа. Плазида стала родоначальником серии векторов и других структур. Особое место в генетическом манипулировании занимает плазида, относящаяся к группе колициногенных плазмид *E.coli*, Col E1, которая реплицируется независимо от хромосомы и присутствует в количестве, примерно, 24 копий на клетку. Ее широко используют благодаря селективному маркеру в качестве вектора для клонирования фрагментов про- и эукариотической ДНК в *E.coli*.

Плазмидные векторы в настоящее время чрезвычайно разнообразны за счет следующих свойств:

– уменьшения размеров плазмиды вследствие изъятия участков, не обязательных для репликации (чем больше плазида содержит уникальных участков узнавания для рестриктаз, тем они универсальнее);

– гибридизации векторов одного рода с другими векторами или природными плазмидами (например, получены гибридные векторы комбинацией плазмиды и фага- λ), при этом вновь сконструированная рекомбинантная ДНК должна сохранить репликационные свойства исходной плазмиды;

– использования новых плазмид;

– применения транспозонов;

– создания векторов с генетическими маркерами, позволяющими вести отбор рекомбинантных клонов.

Векторные плазмиды и векторные вирусы со встроенными чужеродными генами часто называют гибридными или химерными плазмидами (или фагами). После конструирования рекомбинантных ДНК их с помощью трансформации вводят в реципиентный организм: бактериальную, грибную, растительную или животную клетку.

Трансформация предусматривает предварительную обработку клеток соединениями, обуславливающими проникновение ДНК внутрь клеток с последующим их помещением в среду, в которой способны существовать только клетки, получившие векторную молекулу (например, в среду с определенным антибиотиком).

Процесс инфицирования клеток с помощью чужеродных ДНК, приводящий к образованию зрелого фагового потомства, назван трансфекцией, то есть вирусные частицы развиваются в клетке, при этом она приобретает новые свойства.

При обработке клеток бактерий хлористым кальцием их клеточные стенки становятся проницаемыми для ДНК. Однако эффективность проникновения экзогенной ДНК в клетку довольно низкая, трансформируется небольшая часть клеток. Из общей массы их отделяют клонированием. Для этого бактериальную суспензию высевают в чашки Петри из расчета от 5 до 10 бактерий на 1 см³ поверхности. Одна клетка образует на поверхности маленькую колонию, называемую клоном. Из одной клетки образуется один клон, все клетки которого имеют свойства бактерии-родоначальника.

Вопросы для самоподготовки:

1. Какие болезни подлежат генотерапии?
2. Какие заболевания называются наследственными?

3. Стратегия генной терапии в борьбе с опухолями?
4. Какие методы применяются в генной археологии?
5. Трансгенные микроорганизмы как инструмент исследования генов эукариот.
6. Какую опасность может представлять интродукция трансгенных организмов в окружающую среду?

Тестовые задания:

1. Преимуществом генно-инженерного инсулина является:
 - а) высокая активность;
 - б) меньшая аллергенность;
 - в) меньшая токсичность;
 - г) большая стабильность.

2. Функциональная активность ДНК-лигаз:
 - а) лизирование (растворение, гидролиз) ДНК;
 - б) образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных цепей;
 - в) метилирование нуклеотидов;
 - г) нейтрализация ДНК;
 - д) расщепление ДНК.

3. Транскрипцией называют:
 - а) считывание информации с ДНК на информационную РНК;
 - б) присоединение аминокислоты к транспортной РНК;
 - в) синтез рекомбинантной РНК;
 - г) синтез белковой молекулы.

4. Для введения рекомбинантной ДНК в производстве препаратов методом генетической инженерии используют:
 - а) хромосомы;
 - б) плазмиды;
 - в) рибосомы;
 - г) бактериофаги;
 - д) лизосомы;
 - е) ядра клеток.

5. Сигнальная трансдукция:

- а) передача сигнала от клеточной мембраны на геном;
- б) инициация белкового синтеза;
- в) посттрансляционные изменения белка;
- г) выделение литических ферментов.

6. Отбор трансформированных клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (гибридную плазмиду) проводят:

- а) тестированием на резистентность к различной температуре;
- б) тестированием на резистентность к определенным антибиотикам;
- в) по способности окрашиваться гематоксилином;
- г) по морфологическим признакам;
- д) по скорости роста и размножения;

7. При синтезе белка каждой аминокислоте соответствует:

- а) два нуклеотида ДНК;
- б) три нуклеотида;
- в) четыре нуклеотида;
- г) разным аминокислотам соответствует разное число нуклеотидов.

8. Способы введения клонированных генов в соматические клетки осуществляется с помощью:

- а) микроинъекции;
- б) химических реагентов, изменяющих проницаемость мембран;
- в) липосом, «теней» эритроцитов;
- г) экстракорпоральной обработки хромосом бактериальной клетки;
- д) инфекцией клетки рекомбинантными вирусами.

9. Успехи генетической инженерии в области создания рекомбинантных белков более высокие, чем в области создания рекомбинантных антибиотиков, что объясняется:

- а) более простой структурой белка;
- б) трудностью подбора клеток хозяев для биосинтеза антибиотиков;
- в) большим количеством структурных генов, включенных в биосинтез антибиотиков;
- г) проблемами безопасности производственного процесса.

10. Процессы транскрипции идут:

- а) постоянно с одинаковой скоростью;
- б) под контролем регуляторных систем;
- в) периодически по мере накопления энергии;
- г) сопряжено с процессами формирования молекул ДНК;
- д) со скоростью, пропорциональной формированию структурных генов.

11. Преимуществом получения видоспецифических для человека белков путем микробиологического синтеза:

- а) простота оборудования;
- б) экономичность;
- в) отсутствие дефицитного сырья;
- г) снятие этических проблем.

12. Трансляцией называют:

- а) считывание информации с ДНК на информационную РНК;
- б) присоединение аминокислоты к транспортной РНК;

Тема 2.2. Биотехнология и новейшие генетические методы диагностики. Генетическое и физическое картирование генома.

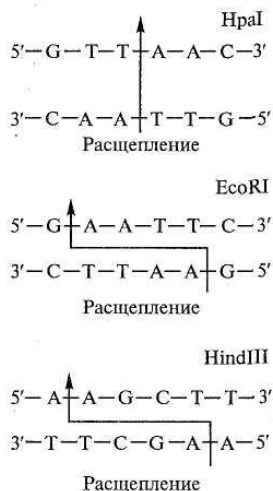
Содержание темы:

- Рестрикционный анализ.
- Ферменты рестрикции.
- Происхождение ферментов рестрикции.
- Физическое картирование.
- Методы молекулярно-генетической диагностики. ПЦР, её виды.
- Секвенирование.

Расщепление ДНК в специфических участках нуклеотидных последовательностей осуществляется особыми ферментами – рестрикцирующими нуклеазами, способными разрушить чужеродную ДНК. Все ферменты можно условно разделить на следующие группы:

- 1) используемые для получения фрагментов ДНК;
- 2) синтезирующие фрагменты ДНК на матрице РНК;
- 3) соединяющие фрагменты ДНК;
- 4) позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК;
- 5) применяемые для приготовления гибридизационных проб.

Каждый фермент, способный разрушить чужеродную ДНК, опознает в ней последовательность из 4...6 нуклеотидов. В настоящее время выпускается более 100 разнообразных рестриктаз. Каждый фермент опознает различные последовательности нуклеотидов и специфично разрывает их. При разрыве образуется серия фрагментов, называемая рестрикционной (рестрикта), с



тупыми либо липкими концами. Преимущественно разрывается двунитевая ДНК.

Многие рестриктазы вносят разрывы в две цепи ДНК со смещением на несколько нуклеотидов и образованием на концах фрагментов коротких одноцепочечных участков. Они способны образовывать комплементарные пары оснований с любым другим одноцепочечным участком, полученным с помощью того же фрагмента (липкие концы). Липкие концы позволяют легко соединить два любых фрагмента ДНК в одно целое. Полученный фрагмент ДНК можно встроить в очищенную ДНК плазмиды или бактериального вируса.

Сравнение размеров фрагментов ДНК после обработки соответствующего участка генома набором рестриктаз позволяет построить рестрикционную карту, отражающую расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке. Сравнением таких карт можно оценить степень гомологии между отдельными генами без определения их нуклеотидной последовательности. Рестрикционные карты важны для клонирования ДНК, решения эволюционных и филогенетических задач.

В генной инженерии важно быстро секвенировать (определить последовательность нуклеотидов) любые очищенные фрагменты ДНК. В настоящее время такую информацию обрабатывают с помощью компьютерных программ. В биотехнологии рекомбинантных ДНК

используют химический и ферментативный методы секвенирования. Оба метода быстры и результативны.

Вопросы для самоподготовки:

1. Что такое "генная дактилоскопия"?
2. Что такое "генная археология"?
3. Какие заболевания диагностируются генной диагностикой?

Тестовые задания:

Ниже приведены 4 правильных ответа для 8 задач (4.1 – 4.8).
Поставьте в ответах те номера задач, которые им соответствуют.

- В приведенной ДНК имеется один участок распознавания: ГГАТЦЦ для рестриктазы Bam I. Поэтому ДНК может быть разрезана в одном месте с образованием двух фрагментов.
- Рестриктаза EcoR I может разрезать фрагмент **а**.
- Частота встречаемости четырехнуклеотидного фрагмента ЦЦГГ составит $(1/4)^4 = 1/256$. Таким образом, средняя длина фрагментов ДНК при разрезании Hra II составит 256 нуклеотидных пар.
- Средняя длина фрагментов ДНК при разрезании рестриктазами, узнающими восьминуклеотидную последовательность, составит 65536 нуклеотидных пар.
- Средняя длина фрагментов при разрезании рестриктазами составит 53637 нуклеотидных пар.

Задачи

- 4.1.** Фрагмент человеческой ДНК длиной 2 тысячи нуклеотидных пар (2 килобазы) имеет один сайт рестрикции для фермента EcoRI. Сколько фракций ДНК будет присутствовать на фореграмме, окрашенной этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, обработанной EcoRI?
- 4.2.** Фрагмент мышинной ДНК длиной 8 тысяч нуклеотидных пар имеет два сайта рестрикции для фермента BamI. Как будет выглядеть электрофореграмма, окрашенная этидиум бромидом, после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, разрезанной этой рестриктазой на неровные части?

4.3. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК (мтДНК) имеет один сайт рестрикции для рестриктазы EcoRI.

Сколько фракций ДНК будет присутствовать на фореграмме после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК, обработанной EcoRI?

4.4. Фрагмент бактериальной ДНК длиной 5 килобаз имеет один сайт рестрикции для фермента EcoRI и два сайта для BamI.

Как будет выглядеть электрофореграмма после электрофореза в агарозном геле образца этой ДНК обработанной только EcoRI, только BamI, а также смесью этих двух рестриктаз?

4.6. Полученную выше смесь рестрикционных фрагментов ДНК обработали еще одним ферментом – EcoRI, при этом в спектре исчезла фракция 3 кб, но появилась новая – величиной 1.5 кб. Какой вид будет иметь рестрикционная карта в этом случае?

4.8. Имеется последовательность очищенной молекулы ДНК. После обработки этой ДНК ферментом EcoRI получены фрагменты 1, 2, 3 и 4.

Каждый из четырёх фрагментов был разрезан HindIII. В результате фрагмент 3 разрезался на два субфрагмента 31 и 32, а фрагмент 2 распался на 21, 22 и 23.

После обработки исходной целой ДНК ферментом HindIII получено четыре фрагмента А, Б, В и Г. Когда каждый из этих фрагментов обработали EcoRI, то фрагмент Г разрезался на фрагменты 1 и 31, А расщепился на 32 и 21 и Б разрезался на 23 и 4. Фрагмент В оказался идентичным с 22. Нарисовать рестрикционную карту исходной ДНК.

Раздел 3. Промышленная и экологическая биотехнология.

Тема 3.1. Биообъект. Промышленные биотехнологии

Содержание темы:

- Понятие о биообъекте. Классификация биообъектов. Генетический контроль за функционированием биообъектов. Подходы к совершенствованию биообъектов (использование природных механизмов изменчивости для направленной селекции и искусственного отбора биообъектов). Биообъекты в фармации, гигиене и санитарии.

-Условия работы биообъектов в биотехнологических системах (биотехнологический процесс с начала и до конца обеспечивается

биообъектом (на примере технологий получения витамина С, В12, рибофлавина, стрептокиназы, некоторых антибиотиков).

- Основные биообъекты биотехнологии: микроорганизмы, клетки и ткани растений, животных и человека, биокатализаторы.

- Сырьевая база биотехнологии.

- Типовые технологические приемы и аппаратное оформление: стадий культивирования (биосинтеза), поддержания асептических условий, температуры, рН среды; стадий выделения и очистки продуктов биосинтеза.

- Вспомогательные стадии технологического процесса и их роль в биотехнологическом производстве.

- Биотехнологический процесс — стартовый этап для получения исходного сырья (на примере технологий получения дифтерийного анатоксина); использование биотехнологического процесса на одном из этапов получения лекарственного средства (биотрансформация — на примере технологии получения витамина С).

- Микробиологическое производство возобновляемых источников энергии: низших спиртов, метана биоконверсией органических отходов и растительного сырья. Производство тепла аэробным окислением органических веществ.

Биообъект — это продуцент, биосинтезирующий нужный продукт, либо катализатор, фермент, который катализирует присущую ему реакцию.

1) Макромолекулы:

- *ферменты всех классов* (чаще гидролазы и трансферазы);
 - в т.ч. в иммобилизованном виде (связанные с носителем) обеспечивающем многократность использования и стандартность повторяющихся производственных циклов
- *ДНК и РНК* — в изолированном виде, в составе чужеродных клеток

2) Микроорганизмы:

- *вирусы* (с ослабленной патогенностью используются для получения вакцин);
- *клетки прокариоты и эукариоты*

- продуценты первичных метаболитов: аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов для заместительной терапии и т.д.);
- продуценты вторичных метаболитов: антибиотики, алкалоиды, стероидные гормоны, и др.
- *нормофлоры* – биомасса отдельных видов микроорганизмов применяемые для профилактики и лечения дисбактериозов
- *возбудители инфекционных заболеваний* – источники антигенов для производства вакцин
- *трансгенные м/о или клетки* – продуценты видоспецифичных для человека белковых гормонов, белковых факторов неспецифического иммунитета и т. д.

3) Макроорганизмы

- *высшие растения* – сырье для получения БАВ ;
- *Животные* - млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии, членистоногие, рыбы, моллюски, человек
- *Трансгенные организмы*

Цели совершенствования БО:

(применительно к производству)

- увеличение образования целевого продукта;
- снижение требовательности к компонентам питательных сред;
- изменение метаболизма биообъекта, например снижение вязкости культуральной жидкости;
- получение фагоустойчивых биообъектов;
- мутации, ведущие к удалению генов, кодирующих ферменты.

Промышленные биотехнологии

Мировой объем производства химических веществ (технические спирты, полимеры, кетоны, оксиды и другие вещества) из возобновляемых источников сырья превысил в 2010 г. 41 млрд. долл. США. Эксперты прогнозируют, что к 2015 г. объем такого производства вырастет почти в два

раза и составит более 76 млрд. долл. США.. В России производства химических веществ из возобновляемых источников сырья, основанные на современных передовых технологиях, в настоящее время не существуют, и их необходимо создавать.

Биополимеры

Мировой рынок биополимеров демонстрирует высокие темпы роста. В 1995 г. суммарные производственные мощности по выпуску биополимеров в мире составляли около 20 тыс. тонн, в 2006 г. - 360 тыс. тонн, а по итогам 2009 г. превысили 800 тыс. тонн. Объем мирового рынка биополимеров в денежном выражении в 2010 г. оценивается в 3,2 млрд. долл. США, а к 2015 г. прогнозируется рост до 4,9 млрд. долл. США. Наиболее широкое распространение биополимеры получили в сфере производства упаковочных материалов, а также изделий медицинского назначения.

Потенциал замещения традиционных полимеров биополимерами составляет около 205 млн. тонн или 90% от текущего объема их общемирового потребления. В Российской Федерации данная отрасль отсутствует.

Биопрепараты промышленного назначения.

К основным биопрепаратам промышленного назначения относятся промышленные ферменты, органические кислоты, биодеструкторы нефти и реагенты для производства целлюлозно-бумажной продукции.

Объем мирового рынка технологических ферментов в 2010 г. составил 2,8 млрд. долл. США без учета объемов производства ферментов для биотоплива. В структуре мирового потребления ферментов страны Северной Америки и Европы занимают доминирующее положение. По итогам 2010 г. на указанные региональные рынки приходилось около 73% мирового объема продаж ферментных препаратов. Доля стран Азиатско-Тихоокеанского региона оценивается в 19%, стран Латинской Америки – 8%.

По состоянию на 2010 г. рынок промышленных ферментных препаратов России оценивается в 138 млн. долл. США. В среднесрочном периоде ожидается стабильный объем потребления в пищевой промышленности (возможны, однако, структурные изменения внутри сектора), рост потребления в сельском хозяйстве и в секторе синтетических моющих средств. Ожидается, что к 2015 г. рынок достигнет 230 млн. долл. США.

В 2010 г. объем предложения на рынке органических кислот, получаемых биосинтезом, составил 48 млн. долл. США. Из числа органических кислот наиболее значимо в промышленных масштабах представлены: лимонная кислота (77% от объема рынка), молочная кислота (16%) и винная кислота (6%). На долю импорта приходится 65% от стоимостной оценки.

При сохранении темпов роста 2009-2010 гг., объем предложения на рынке органических кислот к 2015 г. может достигнуть 78 млн. долл. США.

В настоящее время в России 100% реагентов для производства целлюлозы импортируется. Рынок небольшой (менее 10 млн. долл. США в год), но активно растущий – увеличился в несколько раз за последние три года. Темпы роста сохранятся в ближайшие 5-7 лет, что связано, во-первых, с ужесточением экологических требований к ЦБК и, во-вторых, существенным ростом объемов производства целлюлозы (за счет модернизации и строительства новых ЦБК).

Вопросы для самоподготовки:

1. Типовые технологические приемы и особенности культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений, животных и человека.

2. Получение внеклеточных и внутриклеточных продуктов биосинтеза и биотрансформации в лаборатории и производстве.

3. Особенности иммобилизации биообъектов и их применение в биотехнологии.

Тема 3.2. Биотехнологические процессы очистки воздуха и воды.

Содержание темы:

- Тестирование биологически активных веществ по типовым схемам, надежности процесса, охраны окружающей среды, контроля и безопасных условий эксплуатации.
- Биологическая характеристика проблем охраны и восстановления окружающей среды. Аэробные процессы очистки воздуха и воды.
- Анаэробные процессы переработки органических отходов, характеристика и применение биогаза.
- Методы борьбы с метаном в шахтах.
- Утилизация углекислоты с помощью микроорганизмов.

К наиболее перспективным методам защиты окружающей среды нового поколения относятся биологические методы очистки. Мировой рынок биологических методов обработки загрязненных углеводородами территорий по итогам 2010 г. составил около 4,2 млрд. долл. США. Лидером мирового рынка в части использования технологий биологической ремедиации отходов нефти и нефтепродуктов являются США. Рынок России характеризуется крайне незначительной степенью использования биологических методов очистки загрязненных территорий от нефти и нефтепродуктов, несмотря на

наличие развитой нефтедобывающей отрасли, а также значительной потенциальной емкости рынка для продуктов данного вида. По экспертным оценкам, ежегодные потери нефти в России достигают 1,5-2,0% от суммарного объема ее добычи в стране, а потери нефтепродуктов оцениваются в 0,1-0,5% от суммарного объема их производства. Ежегодно в России происходит более 40 тыс. аварий, связанных с разливами нефти и нефтепродуктов, а суммарная площадь территории страны, загрязненной нефтепродуктами, составляет более 800 тыс. га. При этом, объем продаж биодеструкторов в России в 2010 г. не превысил 1 млн. долл. США, более 80 % продукции импортируется.

Важнейшая проблема экологической биотехнологии – очистка сточных вод. Потребность в воде в связи с ростом городов, бурным развитием промышленности, интенсификацией сельского хозяйства огромна. Ежегодный расход воды на земном шаре по всем видам водоснабжения составляет от 3300 до 3500 км³, при этом в сельском хозяйстве – 70 % всего водопотребления. Для производств химической, целлюлозно-бумажной, энергетической промышленности, черной и цветной металлургии и бытовых нужд населения требуется также значительное количество воды. Большая часть этой воды после ее использования возвращается в реки и озера в виде сточных вод.

На современном этапе выделяются следующие направления рационального расхода водных ресурсов: более полное использование и расширение воспроизводства ресурсов пресных вод; разработка новых биотехнологических процессов, позволяющих предотвратить загрязнение водоемов и свести к минимуму потребление свежей воды.

Загрязнение поверхностных и подземных вод можно подразделить на несколько типов: механическое, сопровождающееся повышением содержания механических примесей и относящееся, в основном, к поверхностным видам загрязнений; химическое, обусловленное присутствием в воде органических и неорганических веществ токсического и нетоксического действия; биологическое, связанное с наличием в воде разнообразных патогенных микроорганизмов, грибов и мелких водорослей; радиоактивное; тепловое. Основные источники загрязнения и засорения водоемов – недостаточно очищенные сточные воды промышленных и коммунальных предприятий, крупных животноводческих комплексов, отходы производства при разработке рудных ископаемых (воды шахт, рудников); сбросы водного и железнодорожного транспорта; пестициды и

т.д. Загрязняющие вещества, попадая в природные водоемы, качественно изменяют их состав.

Сточные воды содовых, сульфатных, азотно-туковых заводов, обогатительных фабрик свинцовых, цинковых, никелевых руд, содержащие кислоты, щелочи, ионы тяжелых металлов, меняют физические свойства воды (появление неприятных запахов, привкусов и т.д.). Сточные воды нефтеперерабатывающих, нефтехимических заводов, предприятий органического синтеза содержат различные нефтепродукты, аммиак, альдегиды, смолы, фенолы и другие вредные вещества. Вследствие окислительных процессов уменьшается содержание в воде кислорода, ухудшаются ее органические показатели.

Нефть и нефтепродукты – основные загрязнители внутренних водоемов, вод и морей Мирового океана – создают разные формы загрязнения: плавающую на воде нефтяную пленку, осевшие на дно водоемов тяжелые фракции. Вода приобретает токсические свойства и представляет собой угрозу для всего живого: 12 г нефти делают непригодной для употребления одну тонну воды. Вредным загрязнителем промышленных вод является фенол, содержащийся в сточных водах многих нефтехимических предприятий. На жизнь населения водоемов пагубно влияют сточные воды целлюлозно-бумажной промышленности. Окисление древесной массы сопровождается поглощением значительного количества кислорода, что приводит к гибели икры, мальков и взрослых рыб. Сточные воды, имеющие повышенную радиоактивность (100 кюри на 1 л и более), подлежат захоронению в подземные бессточные бассейны и специальные резервуары.

В значительной степени загрязняют водоемы моющие синтетические средства, широко используемые в быту, промышленности и сельском хозяйстве и парализующие жизнедеятельность бактерий. Пестициды, попадая в водоемы, накапливаются в планктоне, бентосе, рыбе и по цепочке питания попадают в организм человека, действуя отрицательно, как на отдельные органы, так и на организм в целом. Сточные воды, содержащие отходы кожевенной и целлюлозно-бумажной промышленности, сахарных и пивоваренных заводов, предприятий мясомолочной, консервной и кондитерской промышленности, служат причиной органических загрязнений водоемов. Нагретые сточные воды тепловых электростанций вызывают тепловое загрязнение, которое резко изменяет термический режим, отрицательно влияет на флору и фауну водоемов. Возникают благоприятные условия для массового развития в водохранилищах сине-зеленых водорослей (так называемое «цветение воды»).

Методы очистки сточных вод

Применение того или иного метода (механического, химического, физико-химического и биологического) в каждом конкретном случае определяется характером и степенью вредности примесей.

Механические методы

Сущность этих методов состоит в том, что из сточных вод путем отстаивания и фильтрации удаляют механические примеси. Грубодисперсные частицы в зависимости от размеров улавливаются решетками, ситами, песколовками, навозоуловителями, нефтеловушками и т.д. Механическая очистка позволяет выделять из бытовых сточных вод до 60...75 % нерастворимых примесей, а из промышленных – до 95 %, многие из которых как ценные примеси используются в производстве.

Химические методы

В сточные воды добавляют различные химические реагенты, которые вступают в реакцию с загрязнителями и осаждают их в виде нерастворимых осадков. Химическая очистка уменьшает количество нерастворимых примесей до 95 %, а растворимых – до 25 %.

Физико-химические методы

Эти методы используют для удаления тонкодисперсных и растворенных неорганических примесей, а также для разрушения органических и плохо окисляемых веществ. В арсенал этих методов входят электролиз, окисление, сорбция, экстракция, ионообменная хроматография, ультразвук, высокое давление и др.

Биологический метод

Этот метод основан на использовании закономерностей биохимического и физиологического самоочищения рек и других водоемов. Для очистки сточных вод используют биофильтры, биологические пруды и аэротенки.

В биофильтрах сточные воды пропускают через слой крупнозернистого материала, покрытого тонкой бактериальной пленкой, благодаря которой интенсивно протекают процессы биологического окисления. В биологических прудах в очистке сточных вод принимают участие все организмы, населяющие водоем.

Аэротенки – огромные резервуары из железобетона, в которых очистка происходит с помощью активного ила из бактерий и микроскопических животных, которые бурно развиваются в этих сооружениях, чему способствуют органические вещества сточных вод и избыток кислорода, поступающего с потоком подаваемого воздуха. Бактерии, склеивающиеся в хлопья, выделяют в среду ферменты, разрушающие органические

загрязнения. Ил с хлопьями оседает, отделяясь от очищенной воды. Инфузории, жгутиковые, амёбы, коловратки и другие мельчайшие животные, пожирая бактерии, не слипшиеся в хлопья, тем самым омолаживают бактериальную массу ила. Сточные воды сначала подвергают механической, а после химической очистке для удаления болезнетворных бактерий путем хлорирования жидким хлором или хлорной известью. Для дезинфекции используют также ультразвук, озонирование, электролиз и другие методы.

Биологический метод дает существенные результаты при очистке коммунально-бытовых стоков, а также отходов предприятий нефтеперерабатывающей, целлюлозно-бумажной промышленности и производства искусственного волокна.

Отстой сточных вод и его использование

В зависимости от степени обработки отстой городских сточных вод обычно делят: на *первичный* (необработанный), состоящий из твердых веществ; *вторичный* – твердые вещества, выделяющиеся после вторичного отстоя, или отстой с биофильтров очистных сооружений; *третичный* – результат третичного отстоя сточных вод (известь и глина); *отстой, перегнивший в анаэробных условиях*.

До осушки отстой содержит большое количество влаги (до 95 %). После некоторой стабилизации отстоя, которая достигается путем его сбраживания, содержание твердых веществ составляет 30 %.

Доля содержания органической части в городских сточных водах колеблется от 50 % в перегнившем отстое до 70 % в необработанном отстое. Энергосодержание необработанного отстоя составляет около 16284 кДж/год. Однако практическое использование отстоя в качестве топлива связано с рядом трудностей: высокое содержание влаги не позволяет использовать отстой без высушивания, на которое расходуется фактически вся выделяемая в процессе его горения энергия.

При очистке сточных вод применяют и метановое брожение, которое осуществляется в реакторах (метантенках) двух типов: в реакторах без фиксации биомассы и в реакторах с прикрепленной (фиксированной) биомассой. В качестве подложки, к которой прикрепляется биомасса, используют мелкий песок, окись алюминия и другие носители. В последнее время анаэробное метановое брожение применяют и для детоксикации стоков. Анаэробные бактерии помимо деградации углеводов, липидов, белков, нуклеиновых кислот способны разрушать и многие отходы нефтехимической промышленности, например, бензойную кислоту.

Адаптированные ассоциации анаэробов деградируют ацетальдегид, ацетон, бутанол, этилацетат, этилакрилат, глицерол, нитробензол, фенол, пропанол, пропиленгликоль, кротоновую, фумаровую и валериановую кислоты, винилацетат, парафины, синтетические полимеры и многие другие вещества.

Вопросы для самоподготовки:

1. Принципы биологических методов аэробной и анаэробной переработки промышленных и с/х отходов
2. Биотехнологические методы переработки городских и промышленных стоков. Конструкция и принцип действия промышленных биофильтров и аэротенков.
3. Техника очистки городских стоков.
4. Переработка твердых отходов.
5. Принципы применения и типы биотехнологических установок и методов для очистки газовоздушных выбросов.
6. Биологические процессы в деградации ксенобиотиков.
7. Использование моноклональных антител для очистки биологических жидкостей.

Раздел № 4. Современные достижения биотехнологии в сельском хозяйстве.

Тема 4.1: Микробиологическое производство антибиотиков, витаминов, премиксов кормового назначения.

Цель занятия: познакомить студентов с биотехнологическими методами при производстве препаратов для ветеринарии и зоотехнии.

Содержание темы:

- Микробиологическое производство витаминов, ферментных препаратов, индивидуальных аминокислот различного назначения.
- Микробиологическое производство индивидуальных органических кислот, антибиотиков различных классов. Полусинтетические антибиотики бета-лактамного класса. Основы технологии.
- Микробиологическое производство антибиотиков кормового назначения. Микробиологическое производство концентратов витаминов кормового назначения. Производство премиксов. Перспективы биотехнологии в сельском хозяйстве.

Текущий объем мирового рынка ветеринарных биопрепаратов оценивается в 4,8 млрд. долл. США. В настоящее время негативные факторы воздействия на рынок практически полностью нивелированы, и к 2015 г. ожидается увеличение объема рынка до 5,6 млрд. долл. США.

Доля Российской Федерации составляет порядка 5% мирового рынка. Основу рынка в России составляют импортные биологические препараты, а в структуре потребления отечественных препаратов преобладают продукты с низкой доходностью (например, вакцины), имеющие, тем не менее, определенный экспортный потенциал.

В период 2005-2010 гг. объем потребления антибактериальных препаратов (в том числе терапевтических антибиотиков и антибактериальных премиксов) возрос с 28 до 93 млн. долл. США. Ключевым сегментом, обеспечивающим увеличение объемов, является сектор терапевтических антибиотиков, на долю которых приходится свыше 80% объема в денежном выражении. В настоящий момент рынок антибактериальных препаратов (как терапевтических, так и антибактериальных премиксов) является практически полностью зависимым от импортных поставок. В перспективе 2015 г. потенциальный объем потребления всех типов антибиотиков оценивается в 145 млн. долл. США.

По состоянию на 2010 г. объем рынка кормовых пробиотиков в Российской Федерации оценивался в 20 млн. долл. США. К 2015 г. прогнозируется объем потребления до 40 млн. долл. США, показатель среднегодового темпа роста составит 19%.

В 2010 г. объем производства в Российской Федерации микробиологического кормового белка составил 31 млн. долл. США, в 2015 г. объем производства может вырасти до 35 млн. долл. США.

В 2010 г. в Российской Федерации рынок аминокислот, получаемых биотехнологическим способом, составил 133 млн. долл. США. В структуре рынка основная доля приходится на аминокислоты лизин и треонин. При сохранении существующих показателей прироста предложение на рынке аминокислот к 2015 г. может достигнуть 83 тыс. тонн и 265 млн. долл. США.

В сельском хозяйстве биологические препараты для лечения, профилактики и диагностики заболеваний представлены широким ассортиментом продуктов как импортного, так и российского производства. Нарращивание физических объемов производства в агросекторе имеет серьезные ограничения на мировых рынках: в определенный момент дальнейший рост объемов без изменения технологических подходов (условий выращивания, хранения и транспортировки в растениеводстве,

условий содержания, кормления и переработки в животноводстве) станет невозможен.

Использование биотехнологии в сельском хозяйстве ориентировано на стабильное развитие сельскохозяйственного производства, решение проблемы продовольственной безопасности, получение высококачественных, экологически чистых продуктов питания, переработку отходов сельскохозяйственного производства, восстановление плодородия почв. В данном направлении наиболее приоритетным является:

- создание новых сортов сельскохозяйственных растений и животных с использованием современных постгеномных и биотехнологических методов;
- разработка и внедрение методов геномной паспортизации для повышения эффективности селекционно-племенной работы, технологий клонирования животных-производителей;
- производство биопрепаратов для растениеводства;
- производство кормовых добавок для сельскохозяйственных животных;
- производство ветеринарных биопрепаратов.

Для реализации этого направления, указанные ниже комплексы мероприятий будут включены в государственную программу Российской Федерации "Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия", ответственным исполнителем которой является Минсельхоз России.

Вопросы для самоподготовки:

1. Особенности получения и применения биопрепаратов для сельского хозяйства.
2. Основные группы противомикробных препаратов.
2. Классификация антибиотиков.
3. Коммерческие препараты аминокислот кормового назначения.
4. Производство премиксов для животноводства в Новосибирской области.
5. Актуальность производства и использования бактериальных удобрений и микробиологических средств в агропромышленном комплексе.
6. Лекарственные препараты, пищевые добавки продуцируемые трансгенными микроорганизмами
7. Как используется трансгенез микроорганизмов в биологической промышленности?

8. Технология получения биологических удобрений. Продуценты, среды, ферментационная техника.
9. Биологические методы и препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений и животных.
10. Технология получения и применения биологических препаратов (бактериальных, грибных, вирусных) для агропромпромышленного комплекса.
11. Микробиологическое производство антибиотиков кормового назначения.
12. Микробиологическое производство концентратов витаминов кормового назначения.
13. Производство премиксов.

Тестовые задания:

1. Антибиотики являются:

- а) первичными метаболитами;
- б) вторичными метаболитами.

2. Основное преимущество полусинтетических производных эритромицина-, азитро-, рокситро-, кларитромицина перед природным антибиотиком обусловлено:

- а) меньшей токсичностью;
- б) бактерицидностью;
- в) активностью против внутриклеточно локализованных паразитов;
- г) действием на грибы.

3. Из вторичных метаболитов микроорганизмов ингибитором сигнальной трансдукции является:

- а) стрептомицин;
- б) нистатин;
- в) циклоспорин А;
- г) эритромицин.

4. Биологическая роль антибиотиков:

- а) необходимы для деления клеток;
- б) это одна из форм микробного антагонизма;
- в) являются кофакторами ферментов, принимающих участие в синтезе клеточной мембраны;
- г) являются кофакторами ферментов, принимающих участие в формировании клеточной стенки.

5. Основное преимущество ферментативной биоконверсии стероидов перед

химической трансформацией состоит:

- а) в доступности реагентов;
- б) в избирательности воздействия на определенные функциональные группы стероида;
- в) в сокращении времени процесса;
- г) в получении принципиально новых соединений.

6. Процессы, не характерные для тропофазы стадии биосинтеза антибиотиков:

- а) меньшей токсичностью;
- б) бактерицидностью;
- в) активностью против внутриклеточно локализованных паразитов;
- г) действием на грибы.

7. Антибиотики с самопротитированным проникновением в клетку патогена:

- а) бета-лактамы;
- б) аминогликозиды;
- в) макролиды;
- г) гликопептиды.

8. Источник углерода подбирается с таким расчётом, чтобы:

- а) продуцент активно развивался и в идиофазу, и в тропофазу;
- б) накопление антибиотика максимально шло и в идиофазу, и в тропофазу;
- в) продуцент активно развивался в идиофазу и максимально синтезировал антибиотик в тропофазу;
- г) эффективно шло использование источника азота.

9. Увеличение выхода целевого продукта при биотрансформации стероида достигается:

- а) при увеличении интенсивности перемешивания;
- б) при увеличении интенсивности аэрации;
- в) при повышении температуры ферментации;
- г) при исключении микробной контаминации;
- д) при увеличении концентрации стероидного субстрата в ферментационной среде;
- е) при целенаправленном изменении химической структуры стероидного субстрата.

10. Широкое применение для промышленного выделения и очистки антибиотиков находит:

- а) хроматография в тонких слоях;
- б) ионообменная хроматография;
- в) высокоэффективная жидкостная хроматография;
- г) бумажная хроматография.

11. Скрининг лекарственных средств:

- а) совершенствование путем химической трансформации;
- б) совершенствование путем биотрансформации;
- в) поиск и отбор ("просеивание") природных структур;
- г) полный химический синтез.

12. Антибиотикотолерантность патогена обусловлена:

- а) разрушением антибиотика;
- б) активным выбросом;
- в) низким содержанием автолизина;
- г) отсутствием мишени для антибиотика.

13. Цефалоспорин четвертого поколения устойчивый к беталактамазам грамотрицательных бактерий:

- а) цефалексин;
- б) цефазолин;
- в) цефпиром;
- г) цефаклор.

14. Таргет:

- а) сайт на поверхности клетки;
- б) промежуточная мишень внутри клетки;
- в) конечная внутриклеточная мишень;
- г) функциональная группа макромолекулы.

15. Причины высокой эффективности антибиотических препаратов "уназин" и "аугментин" заключаются:

- а) в невысокой токсичности (по сравнению с ампициллином и амоксициллином);
- б) в невысокой стоимости;

- в) в действии на резистентные к β -лактамам штаммы бактерий;
- г) в пролонгации эффекта.

16. Превращение карденолида дигитоксина в менее токсичный дигоксин (12-гидроксилирование) осуществляется культурой клеток:

- а) *Acremonium chrysogenum*;
- б) *Saccharomyces cerevisiae*;
- в) *Digitalis lanata*;
- г) *Tolypocladium inflatum*.

17. Предшественник при биосинтезе пенициллина добавляют:

- а) в начале ферментации;
- б) на вторые – третьи сутки после начала ферментации;
- в) каждые сутки в течение 5-суточного процесса.

18. Мониторинг (применительно к лекарственному средству):

- а) введение в организм;
- б) выделение;
- в) выявление в тканях;
- г) слежение за концентрацией.

19. Предшественник пенициллина, резко повысивший его выход при добавлении в среду:

- а) β -диметилцистеин;
- б) валин;
- в) фенилуксусная кислота;
- г) α -аминоадипиновая кислота.

20. Комплексный компонент питательной среды, резко повышающий производительность ферментации в случае пенициллина:

- а) соевая мука;
- б) гороховая мука;
- в) кукурузный экстракт;
- г) хлопковая мука.

Тема 4.2. Биотехнологические методы в растениеводстве.

Содержание темы:

- Производство микробных препаратов для растениеводства: для защиты растений от вредных насекомых;

- антибиотиков против корневой гнили и мучнистой росы;
- бактериальных удобрений; стимуляторов роста растений гормональной природы.

-достижения биотехнологии в области создания свободного от вредной микрофлоры посадочного материала (рассады) и трансгенных растений. Проблемы и перспективы.

Биологическая азотфиксация - процесс фиксации атмосферного азота бактериями, живущими в симбиозе с представителями семейства бобовых. Для ускорения заселения ризосферы обычно используют бактериальные удобрения, содержащие культуры азотфиксирующих микроорганизмов, например, клубеньковых бактерий. Методами генной инженерии выведены мутанты клубеньковых бактерий с повышенной способностью к азотфиксации. Ведутся работы по созданию азотфиксирующих растений, способных к симбиозу со злаковыми.

Методами генной инженерии улучшают аминокислотный состав запасных белков растений; повышают эффективность фотосинтеза; улучшают процессы усвоения азота; повышают устойчивость растений к фитопатогенам, гербицидам, насекомым, к абиотичным стрессам.

С помощью клеточной инженерии в области фундаментальных наук стало осуществимым исследование таких проблем, как взаимодействие клеток в тканях, клеточная дифференцировка, морфогенез, реализация тотипотентности клеток, механизм появления раковых клеток и др.

На практике клеточная инженерия используется при селекции, получении ценных метаболитов растительного происхождения, например, дешевых лекарств, безвирусных растений, их клональное размножение и др.

Клональным микроразмножением называют неполовое размножение растений с помощью метода культуры тканей, позволяющее получать растения, идентичные исходному. В основе метода лежит свойство тотипотентности. В настоящее время технология используется коммерчески.

В России работы по клональному микроразмножению были проведены в 60-х годах XX века под руководством Р.Г. Бутенко.

Преимуществами метода перед традиционными считаются следующие:

- высокий коэффициент размножения. Например, одно растение герберы за год при микроклональном размножении дает $1 \cdot 10^6$ новых растений, а при обычных условиях – от 50 до 100;
- получение генетически однородного посадочного материала;

- возможность оздоровления растений, освобождение их от вирусов благодаря клонированию меристематических тканей;
- возможность размножения растений, которые в естественных условиях репродуцируются с большим трудом;
- воспроизведение посадочного материала круглый год;
- сокращение продолжительности селекционной работы.

Обязательное условие клонального микроразмножения – использование объектов, сохраняющих генетическую стабильность на всех этапах процесса – от экспланта до растений в поле. Такому требованию соответствуют апексы и пазушные почки органов стеблевого происхождения, т.е. меристематические ткани (апекс – корень нарастания – верхушка побега и корня, обеспечивающая при росте формирование всех частей и первичных тканей).

Процесс клонального микроразмножения включает три этапа:

- а) получение хорошо растущей стерильной культуры;
- б) собственно размножение;
- в) подготовку к высадке в поле (закаливание, повышение устойчивости к различным факторам среды и патогенным микроорганизмам).

Вопросы для самоподготовки:

1. Новейшие методы биотехнологии для культурных растений.
2. Что такое клон?
3. Техника микрклонального размножения высших растений.
4. Клонирование растений? Как это делается?
5. Назовите известные Вам трансгенные растения?
6. Технология получения и перспективы применения трансгенных растений.
7. Производство микробных препаратов для растениеводства

Тестовые задания:

1. Ауксины - термин, под которым объединяются специфические стимуляторы роста:
 - +А. растительных тканей
 - Б. актиномицетов
 - В. животных тканей
 - Г. эубактерий
 - Д. эукариот

2. Прямой перенос чужеродной ДНК в протопласты возможен с помощью:
- А. микроинъекции
 - Б. трансформации
 - +В. упаковки в липосомы
 - Г. культивирования протопластов на соответствующих питательных средах

**Тема 4.3. Препараты на основе живых культур микроорганизмов.
Применение в животноводстве.**

Содержание темы:

- Препараты на основе живых культур микроорганизмов.
- Понятие о партнерских отношениях между микроорганизмами и организмом животных.
- Роль нормальной микрофлоры кишечника в функционировании организма.
- - Технология получения препаратов нормофлоры и пробиотиков для животноводства.
- Требования к штаммам, используемым для приготовления препаратов на основе живых культур микроорганизмов.

Препараты нормофлоры, их свойства, микроорганизмы для их получения, методы получения и особенности применения.

Препараты: колибактерин, бифидумбактерин, лактобактерин, бификол и другие. Свойства - имеют бактериостатический эффект, бактерицидное действие, препятствуют фиксации патогенна в желудочно-кишечном тракте, вызывая колонизацию эпителия, расщепляют лактозу, метаболизируют холестерин, усиливают иммунитет. Микроорганизмы - бактерии рода *Bactericides*, энтеробактерии *E.coli*, бактерии *Clostridium*, дрожжеподобные грибы рода *Candida* и плесневые грибы. Методы получения - ферментация в биореакторах периодическим способом. Применение - при острой дизентерии, сальмонеллезе, вирусной диарее, при рахите и в др> гих случаях.

Микробные инсектициды. В последнее время все чаще появляются данные о мутагенном и канцерогенном действии химических пестицидов, которые плохо разрушаются и накапливаются в окружающей среде.

Для получения микробных инсектицидов используются вирусы, грибы, простейшие, наиболее удобны - спорообразующие бактерии. Микробные

инсектициды высоко специфичны и действуют только на определенные вредные насекомые, оставляя невредимыми полезные. Патогенность микроорганизмов вызвана действием определенных токсинов, поэтому выработки устойчивости к биопрепаратам у насекомых не происходит.

Микробные пестициды подвержены биodeградации. Микроорганизмы могут регулировать рост растений и животных, подавлять заболевания. Некоторые бактерии изменяют кислотность и соленость почвы, другие продуцируют соединения, связывающие железо, третьи - вырабатывают регуляторы роста. Как правило, микроорганизмами инокулируют семена и или растения перед посадкой.

В животноводстве биотехнология также находит применение. Это диагностика, профилактика, лечение заболеваний с использованием техники моноклональных антител, генетическое улучшение пород животных. Некоторые вещества, полученные с помощью микроорганизмов могут использоваться в виде кормовых добавок, другие - подавляют вредную микрофлору в желудочно-кишечном тракте или стимулируют образование специфических микробных метаболитов.

Вопросы для самоподготовки:

- 1 Понятие о партнерских отношениях между микроорганизмами и организмом животных человека.
2. Роль нормальной микрофлоры кишечника человека в функционировании организма человека.
3. Технология получения препаратов нормофлоры и пробиотиков.
4. Требования к штаммам, используемым для приготовления препаратов на основе живых культур микроорганизмов.
5. Производство пробиотиков для животноводства.

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

Тема 5.1. Биотехнология в воспроизводстве животных.

Содержание темы:

- Биотехнология в воспроизводстве животных.

- Эффективность современных методов биотехнологии в воспроизводстве животных.
- Искусственное осеменение животных.
- Регулирование пола.
- Индукция родов, трансплантация.
- Гормоны в регуляции репродукции.
- Пересадка эмбрионов.
- Получение мозаиков (химер) .
- Клонирование животных.

Клонирование в клетках животных

В целях исследования функционирования генов высших эукариот занимаются проблемой введения генов в клетки млекопитающих. Предварительно клонированные гены вводят в клетку животных различными путями.

Например, метод маркера. Метод служит для идентификации и последующего размножения клеток, содержащих интегрированную ДНК. Пример: предварительно получали рекомбинантную плазмиду *E.coli* с геном тимидинкиназы из вируса герпеса. Затем с помощью полученной плазмиды трансформировали животные клетки, дефектные по синтезу тимидинкиназы, после трансформации они приобретали способность к синтезу фермента на селективной среде.

Также сконструировано большое количество челночных векторов, способных к репликации в животной и бактериальной клетках.

Разработана технология микроинъекции ДНК непосредственно в ядро клетки. Трансформация соматических клеток млекопитающих дает возможность изучать механизмы регуляции экспрессии генов и целенаправленно модифицировать генетический аппарат клетки животных, в том числе человека. Культуры клеток млекопитающих могут быть эффективным источником выделения ряда вирусных антигенов с целью получения вакцин для человека и животных.

В настоящее время разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений с целью изменения свойств организмов, таких как скорость роста, устойчивость к заболеваниям и внешним воздействиям. Такие работы были начаты на крупных яйцах амфибий, теперь продолжены с яйцеклетками и эмбрионами мышей.

Микроинъекцию клонированных генов проводят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. После инъекции

яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приёмной матери или дают развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку. Таким образом были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген глобулина кролика, ген тимидинкиназного вируса герпеса. Выживает от 10 до 30 % яйцеклеток, доля трансгенных мышей составляет от нескольких до 40 %.

До сих пор не удастся встроить чужеродную ДНК в заданный участок хромосомы, вытеснить ген и заменить его другим. Исследования проводятся с целью лечения генетических заболеваний.

Вопросы для самоподготовки:

1.Что такое клон?

2.Что такое клонирование гена?

3.Клонирование животных? Как это делается ?

4.Перспектива клонирования животных?

5.Какое животное клонировано впервые? Когда? Кем?

6.Морально-этические аспекты клонирования ?

7.Чем знаменита овечка Долли?

Тема 5.2 Молекулярно-генетические маркёры. MAS-селекция

Содержание темы:

- Виды и методы селекции животных
- Молекулярно-генетические маркёры.
- Молекулярно-генетические маркёры в селекции.
- Использование маркёров в племенной работе.
- Маркёры и селекционируемые признаки.
- Маркёры на основе полиморфизма белков крови, яиц, молока.
- Гены количественных признаков. Понятие о QTL. MAS-селекция.

Маркер-ассоциированная селекция, MAC (marker-assisted selection, MAS) [франц. *marquer* — отмечать и лат. *assotiatio* — соединение; лат. *selectio* — выбор, отбор] — использование ДНК-маркера для улучшения отбора и реакции организмов на селекцию.

Молекулярными маркерами называют такие биохимические особенности обмена веществ и, непосредственно, структурные особенности генома организма животного, растения, бактерии или гриба, которые тесно коррелируют с какими либо физиологическими показателями организма

(например, активностью ферментов), связанными с хозяйственно полезными признаками этого существа. Используя молекулярно-генетические маркеры селекционер может, с огромной точностью, выбирать из популяции только животных обладающих определённым аллелем, необходимого ему, гена, такого как, например ген устойчивости к лейкозу у коров, и создавать стада устойчивые к заболеваниям, с животными генетическим здоровыми и высоко продуктивными.

В селекции при помощи маркеров используются только природные комплексы генов, характерные для данного вида животных. Эти комплексы прошли через сито естественного отбора у предков домашних животных, поэтому их присутствие в геноме животных является естественным и безопасным как для самого животного, так и для человека потребляющего продукцию от него.

Используемые маркеры должны обладать определёнными свойствами и отвечать ряду требований, к ним относятся:

1. Фенотипические проявления аллельных вариантов должны быть доступны для идентификации у различных особей;
2. Аллельные замещения в одном локусе должны быть отличимы от аллельных вариантов в других локусах;
3. Существенная часть аллельных замещений в каждом изучаемом локусе должны быть доступна для идентификации;
4. Изучаемые локусы должны представлять случайную выборку генов в отношении их физиологических эффектов и степеней изменчивости;
5. Маркеры должны обладать равномерным распределением по локализации в геноме;
6. Маркеры должны обладать лёгкой выявляемостью и воспроизводимостью;
7. Получаемые данные должны быть сопоставимы в разных лабораториях;
8. Необходима возможность автоматизации их выявления;
9. Маркеры должны обладать относительной нейтральностью.

Маркерные гены особенно актуальны для оценки признаков, фенотипическое проявление которых происходит относительно поздно, ограничено полом или на проявление которых большое влияние оказывают факторы окружающей среды. Такими признаками являются: резистентность или предрасположенность к болезням, плодовитость, молочная и мясная продуктивности и т.д. По числу генов, влияющих на проявление признака, все признаки можно подразделить на две категории.

1. Моногенные или олигогенные признаки (главные гены). Для таких признаков, в случае приблизительной локализации гена, существует

возможность идентификации ДНК-маркеров, расположенных внутри главного гена или в непосредственной близости от него.

2. Полигенные признаки (локусы количественных признаков, QTL). К признакам с полигенной природой наследования относятся большинство важных хозяйственно-полезных признаков сельскохозяйственных животных. Полигенная природа признака означает, что его количественный уровень генетически определяется различными аллельными вариантами целого ряда локусов, разбросанных по всему геному.

Генетическое улучшение в стаде может идти по 4 направлениям: отбор отцов и матерей как производителя, так и матки. Применение маркерной селекции возможно как по каждому из них с целью сокращения временного интервала на выявление животных–носителей желательных аллелей по контролируемым или улучшаемым признакам, так и в совокупности (для наиболее полного использования генетического потенциала животных).

Вместе с тем маркерная селекция не отрицает традиционных подходов к генетическому улучшению стад. Более того, оба эти подхода взаимно дополняют друг друга. Использование генетических маркеров позволяет ускорить процесс отбора животных, а индексные методы точнее оценить эффективность этого отбора.

Тема 5.3 Трансгенные животные в сельском хозяйстве

Содержание темы:

- Виды и методы селекции животных.
- Трансгены и трансгенные организмы.
- Сельскохозяйственные трансгенные организмы.
- Трансгенные животные
- Трансгенные животные в сельском хозяйстве.
- Эмбриональные стволовые клетки.
- Перспективы генной инженерии.
- Риски генных технологий.
- Уменьшение риска, связанного с генными технологиями.
- Биотехнология, генетическая и клеточная инженерия.
- Генотерапия

Генетическую инженерию предполагают использовать с целью изменения ряда свойств организма: повышения продуктивности, резистентности к заболеваниям, увеличения скорости роста, улучшения

качества продукции и других. Животных, несущих в своем геноме рекомбинантный ген, принято называть трансгенными, а ген, интегрированный в геном реципиента – трансгеном. Продукт этого гена (белок) является трансгенным.

Получение трансгенных животных предусматривает ряд этапов: приготовление раствора ДНК для микроинъекции, извлечение эмбрионов из донорных организмов, микроинъекция ДНК и пересадка инъецированных эмбрионов в яйцеводы или, после культивирования, в матку синхронизированных реципиентов. У родившегося потомства исследуют экспрессию трансгена на уровне транскрипции и трансляции.

Для трансформирования генов используют следующие приемы:

- микроинъекцию ДНК в пронуклеус зигот или в два пронуклеуса;
- введение ДНК с помощью ретровирусных векторов;
- получение трансгенных химер из генетически трансформированных клеток.

Наиболее распространена микроинъекция. Ее осуществляют с помощью специальной пипетки (внутренний диаметр около 1 мкм), количество инъецируемого раствора ДНК около 1...2 пкл (10^{-9}). После инъекции ДНК эмбрионы культивируют до момента пересадки реципиентам. Затем хирургическим путем эмбрионы переносят в яйцеводы. Каждому реципиенту мыши, кролика и свиньи обычно пересаживают от 20 до 30 инъецированных зигот, причем у свиней все эмбрионы транс плантируют в один яйцевод, у мышей и кроликов – отдельно по яйцеводам. Реципиенту овец, коз и крупного рогатого скота пересаживают по 2...4 эмбриона отдельно по яйцеводам.

Генетический анализ родившихся трансгенных животных и полученного от них потомства показал, что, несмотря на инъекцию ДНК на ранних стадиях, в трансгенных линиях могут появляться так называемые мозаики. К мозаикам относят животных, происходящих из одной зиготы, но имеющих разные генотипы. Помимо клеточных линий, содержащих трансген, они имеют еще и нетрансгенные клеточные линии. Около 30 % первичных трансгенных животных – мозаики, что затрудняет создание чистых трансгенных линий животных. Часть мозаик вообще не может дать начало трансгенным линиям, так как у них отсутствует передача трансгена по наследству.

Одной из задач сельскохозяйственной биотехнологии является создание животных-биореакторов – продуцентов биологически активных веществ. Интерес представляют гены, кодирующие белки каскада гормона роста:

непосредственно гормон роста (ГР), релизинг-фактор гормона роста (РФ), инсулиноподобный фактор гормона роста (ИФГР).

В конце 70-х годов XX века на основе технологии рекомбинантной ДНК получили гормон роста микробного происхождения. Было показано, что гормон роста ГР оказывает такое же стимулирующее действие на лактацию и рост животного, как и гипофизарный ГР. Микробный ГР вызывал увеличение удоев на 23...31 % при дозе 13 мг в день. Инъекции ГР молодняку крупного рогатого скота, свиней и овец увеличивали суточный привес на 20...30 % при сокращении расхода кормов, кроме того, у свиней уменьшалось содержание жира и увеличивалось содержание белка в тканях, что повышало качество мясопродуктов.

Первые трансгенные мыши с геном ГР были получены в 1982 г. У них отмечалось повышение скорости роста и увеличение конечной живой массы. Однако, у трансгенных свиней с геном ГР (1989 г.) увеличение роста не наблюдалось.

По данным Л.К. Эрнста (1996 г) у трансгенных свиней с геном релизинг-фактора ГР конечная живая масса была на 15,7 % выше по сравнению с контрольными животными. У трансгенных овец с генами ГР и РФ, несмотря на повышенный уровень ГР, скорость роста не повышалась. И у овец, и у свиней понижалось содержание жира.

Расширяется возможность создания животных, у которых после синтеза лактозы она будет разлагаться β -галактозидазой, таким образом возможно получение безлактозного молока.

Другая задача сельскохозяйственной биотехнологии – создание трансгенных животных, устойчивых к заболеваниям. Ведутся работы в этом направлении, показано, что защитные механизмы от инфекционных заболеваний обусловлены либо препятствием вторжению возбудителя, либо изменением рецепторов.

В медицине трансгенные животные используются для получения биологически активных соединений, за счет включения в клетки организма генов, вызывающих у них синтез новых белков.

Для молочной промышленности ведется целенаправленная трансгенная экспрессия в эпителиальные клетки молочной железы с целью выхода белков с молоком. Молочная железа – хороший продуцент чужеродных белков, которые можно получать из молока и использовать в фармацевтической промышленности. Из молока трансгенных животных извлекают следующие рекомбинантные белки: человеческий белок С, антигемофильный фактор IX, α -1-антитрипсин, тканевой плазменный ингибитор, лактоферрин,

сывороточный альбумин, урокиназу и химозин. Исследования проводятся на мышах.

Создание клеточных культур и их выращивание в промышленных реакторах, а также выведение трансгенных животных и их обслуживание – дорогие и сложные процедуры. Однако, трансгенные животные легко размножаются, содержание их сравнительно дешево, что делает их хорошими продуцентами разнообразных белков с низкой стоимостью.

В России группой ученых под руководством Л.К. Эрнста получены трансгенные овцы с геном химозина (фермент для получения сыра). В 1 л молока содержится от 200 до 300 мг химозина (3 л молока достаточно для производства 1 т сыра из коровьего молока). Стоимость трансгенного химозина будет в несколько раз ниже, чем традиционного, получаемого из сычугов молочных телят и ягнят.

Вопросы для самоподготовки:

1. Какие методы трансгенеза в естественных условиях Вы знаете?
2. Перечислите методы трансгенеза.
3. Почему ретровирусы являются лучшими векторами при трансгенезе?
4. Что означает генная терапия *ex vivo* ?
5. Использование невирусных векторов для генотерапии
5. Как подавить функцию «испорченного» гена?
6. Какие манипуляции с генами возможны и допустимы?
7. Что такое генная "кройка-шитье"?
8. Что такое "генный нокаут"?
9. Что такое "генная терапия"?
10. Чем обусловлено враждебное отношение некоторых людей к генным технологиям?
11. Основная стратегия генной терапии?
12. Реальная польза и потенциальный риск генных технологий?
13. Какие открытия позволили человечеству управлять геномом?

Раздел 6. Пищевая биотехнология

Тема 6.1. Продукция микробиологического синтеза для пищевой промышленности

Содержание темы:

- Производство белка одноклеточных организмов. Проблемы и перспективы.
- Промышленные штаммы-продуценты. Сырьевая база. Требования, предъявляемые к качеству готового продукта.
- Биомасса промышленных микроорганизмов как сырье для получения широкой гаммы продуктов различного назначения.
- Продукция микробиологического синтеза для пищевой промышленности: производство препаратов ферментов (рениноподобных протеиназ, глюкоизомеразы, бета-галактозидазы, бета-фруктофуранозидазы);
- производства, основанные на получении и переработке биомассы промышленных микроорганизмов (препараты биологически активных добавок, содержащих смеси аминокислот, пептидов, витаминов и микроэлементов; пищевкусовые добавки;
- концентраты и изоляты белковых веществ); производство подсластителей-заменителей сахара (глюкозо-фруктозные сиропы, аспартам); производство консервантов (низина).

Статистические данные ООН по вопросам продовольствия и сельского хозяйства свидетельствуют о том, что проблема обеспечения населения нашей планеты продуктами питания внушает серьезные опасения.

Увеличить количество пищевого белка можно за счет микробиологического синтеза. Микроорганизмы чрезвычайно богаты белком — он составляет 70—80 процентов их веса. Скорость его синтеза огромна. Микроорганизмы примерно в 10—100 тысяч раз быстрее синтезируют белок, чем животные. Здесь уместно привести классический пример: 400-килограммовая корова производит в день 400 граммов белка, а 400 килограммов бактерий — 40 тысяч тонн. Естественно, на получение 1 кг белка микробиологическим синтезом при соответствующей промышленной технологии потребуются средств меньше, чем на получение 1 кг белка животного. Технологический процесс куда менее трудоемок, чем сельскохозяйственное производство.

Применяя обычные технологические линии по производству синтетических волокон, можно получать из искусственных белков длинные нити, которые после пропитки их формообразующими веществами, придания им соответствующего вкуса, цвета и запаха могут имитировать любой белковый продукт. Таким способом уже получены искусственное мясо (говядина, свинина, различные виды птиц), молоко, сыры и другие продукты. Они уже прошли широкую биологическую апробацию на животных и людях и вышли из лабораторий на прилавки магазинов США, Англии, Индии, стран Азии и

Африки. Только в одной Англии их производство достигает примерно 1500 тонн в год. Белковую часть школьных обедов в США уже разрешено на 30 процентов заменять искусственным мясом, созданным на основе соевого белка.

Как питательную добавку в пищу чаще всего вносят лизин и метионин. Глутамат натрия и глицин употребляют как ароматические вещества для усиления и улучшения вкуса пищи. У глицина освежающий, сладкий вкус. Его вводят в сладкие напитки, и кроме того, он проявляет там бактериостатическое действие. Цистеин предотвращает подгорание пищи, улучшает пекарские процессы и качество хлеба. Благодаря некоторым бактериям удается получать около 100 г/л глутаминовой аминокислоты. Ежегодно в мире производят микробиологическим способом 270 000 т этой аминокислоты, основная часть которой идет в пищевую промышленность. По объему продукции второе место после глутаминовой кислоты занимает лизин — 180 000 т в год. Другие аминокислоты производят в гораздо меньших количествах.

Биотехнология молочных продуктов

Спектр продуктов питания, получаемых при помощи микроорганизмов, обширен. Это продукты, получаемые в результате брожения - хлеб, сыр, вино, пиво, творог и так далее. До недавнего времени биотехнология использовалась в пищевой промышленности с целью усовершенствования освоенных процессов и более умелого использования микроорганизмов, но будущее здесь принадлежит генетическим исследованиям по созданию более продуктивных штаммов для конкретных нужд, внедрению новых методов в технологии брожения.

Основой биотехнологии молочных продуктов является молоко. В сквашивании молока обычно принимают участие стрептококки и молочнокислые бактерии. Путем использования реакций, которые сопутствуют главному процессу сбраживания лактозы получают и другие продукты переработки молока: сметану, йогурт, сыр и т.д.

Все технологические процессы производства продуктов из молока делятся на две части: 1) первичная переработка - уничтожение побочной микрофлоры; 2) вторичная переработка. Первичная переработка молока включает в себя несколько этапов. Сначала молоко очищается от механических примесей и охлаждается, чтобы замедлить развитие естественной микрофлоры. Затем молоко сепарируется (при производстве сливок) или гомогенизируется. После этого проводят пастеризацию молока, при этом температура поднимается до 80°C, и оно закачивается в танки или ферментеры. Вторичная переработка молока может идти двумя путями: с

использованием микроорганизмов и с использованием ферментов. С использованием микроорганизмов выпускают кефир, сметану, творог, простокваши, казеин, сыры, биофруктолакт, биолакт, с использованием ферментов - пищевой гидролизат казеина, сухую молочную смесь для коктейлей и т.д. При внесении микроорганизмов в молоко лактоза гидролизруется до глюкозы и галактозы, глюкоза превращается в молочную кислоту, кислотность молока повышается, и при pH 4-6 казеин коагулирует.

Молочнокислое брожение бывает гомоферментативным и гетероферментативным. При гомоферментативном брожении основным продуктом является молочная кислота. При гетероферментативном брожении образуются диацетил (придающий вкус сливочному маслу), спирты, эфиры, летучие жирные кислоты. Одновременно идут протеолитические и липолитические процессы, что делает белки молока более доступными и обогащает дополнительными вкусовыми веществами.

Для процессов ферментации молока используются чистые культуры микроорганизмов, называемые заквасками. Исключение составляют закваски для кефиров, которые представляют естественный симбиоз нескольких видов молочнокислых грибков и молочнокислых бактерий. Этот симбиоз в лабораторных условиях воспроизвести не удалось, поэтому поддерживается культура, выделенная из природных источников. При подборе культур для заквасок придерживаются следующих требований:

- состав заквасок зависит от конечного продукта (например, для получения ацидофилина используется ацидофильная палочка, для производства простокваши - молочнокислые стрептококки);
- штаммы должны отвечать определенным вкусовым требованиям; - продукты должны иметь соответствующую консистенцию, от ломкой крупитчатой до вязкой, сметанообразной;
- определенная активность кислотообразования;
- фагорезистентность штаммов (устойчивость к бактериофагам);
- способность к синерезису (свойству сгустка отдавать влагу);
- образование ароматических веществ; - сочетаемость штаммов (без антагонизма между культурами);
- наличие антибиотических свойств, т.е. бактериостатическое действие по отношению к патогенным микроорганизмам;
- устойчивость к высушиванию.

Культуры для заквасок выделяются из природных источников, после чего проводится направленный мутагенез и отбор штаммов, отвечающих перечисленным выше требованиям. Биотехнологии на основе молока

включают, как правило, все основные стадии биотехнологического производства, которые можно рассмотреть на примере сыроварения.

Сыроварение - один из древнейших процессов, основанных на ферментации. На первом этапе идет подготовка молока (первичная обработка). На втором - готовится культура молочнокислых бактерий. Микроорганизмы подбираются в определенной пропорции, обеспечивающей наилучшее качество. Набор бактерий также зависит от температуры термообработки. Третья стадия - стадия ферментации, - в сыроварении в некоторых случаях происходит в 2 этапа, до и после стадии выделения. Сначала молоко инокулируют определенными штаммами микроорганизмов, приводящими к образованию молочной кислоты, а также добавляют сычужный фермент реннин. После образования сгустка сыворотку отделяют, а полученную творожистую массу подвергают термообработке и прессуют в формах. Далее сгусток солят и ставят на созревание. Иногда полученная масса проходит дополнительную обработку, которая заключается в следующем: заражение спорами голубых плесневых грибов при производстве рокфора; нанесение на поверхность спор белых плесневых грибов при производстве камамбера и бри; нанесение бактерий, необходимых для созревания некоторых сыров. Некоторые сыры после выделения должны подвергнуться дальнейшей ферментации (стадия созревания). Микроорганизмы и ферменты в ходе этого процесса гидролизуют жиры, белки и некоторые другие вещества молодого сыра. В результате их распада образуются вещества, придающие сырам характерный вкус.

Вопросы для самоподготовки:

1. Приведите общую схему биотехнологического производства продуктов микробного синтеза
2. Какие требования предъявляются к питательным средам?
3. Каким образом получают инокулят?
4. Что такое ферментация?
5. Какие способы производства аминокислот вы знаете?
6. Какие аминокислоты получают микробным синтезом?
7. Где применяются аминокислоты?
8. Что такое витамины?
9. Какие витамины получают микробиологическим синтезом?
10. Какие способы производства органических кислот вы знаете?
11. Получение уксусной кислоты.
12. Получение лимонной кислоты.

13. Получение молочной кислоты.

Тема 6.2 Генномодифицированные продукты питания.

Содержание темы:

- Генетически модифицированные источники питания.
- Методы ДНК диагностики в пищевой промышленности.
- Проблемы и перспективы использования ГМО.

Немалый ассортимент пищевых продуктов в настоящее время получают, применяя методику генной инженерии.

В Приложении 9 к СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» приведено трактование термина «генетически модифицированные источники пищи». Так называют используемые человеком в пищу в натуральном или переработанном виде пищевые продукты (компоненты), полученные из генетически модифицированных организмов. А генетически модифицированные организмы, согласно Приложению 9, – это организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в т. ч. гены, их фрагменты или комбинацию генов.

Общественное мнение к генным манипуляциям с продуктами питания относится неоднозначно. В США был проведен социологический опрос. Людям предлагалось ответить на два вопроса: как вы относитесь к трансгенным продуктам? Станете ли их покупать, если они будут улучшенного качества, но дороже? 48% опрошенных дали отрицательный ответ, 30 – положительный, остальные – неопределенный. Когда же вопрос сформулировали по-другому, а именно: если качество новых продуктов останется неизменным, а цена упадет, американские потребители ответили с точностью до наоборот. 48% опрошенных выразили готовность покупать трансгенную еду, 30 – отказались.

В Швейцарии, например, запрещено использовать в виде продуктов генетически трансформированные овощи и фрукты и выпускать их в окружающую среду, но лабораторные исследования ведутся в закрытых системах, под жестким контролем.

В ФРГ в 1996 г. активисты антигенного движения разорили 14 опытных полей Института им. Макса Планка. В то же время бельгийцы и канадцы сеют устойчивый к гербицидам рапс, из которого делают масло. Французы возделывают невосприимчивый к ядохимикатам табак.

В США разрешено продавать 16 наименований генетически модифицированных растений, 6 из них созрели в лабораториях Монсанто, в т. ч. помидоры. Такие помидоры собирают бурыми и хранят при температуре 12°C. При комнатной температуре овощи за считанные часы становятся кроваво-красными и очень долго сохраняют свой товарный вид. Шесть культур выведены из-под государственного регулирования. В Зеленограде вывели необыкновенно устойчивый трансгенный картофель.

Директор Информационного центра по биотехнологии при Международном совете научных союзов и Российской Академии наук А.Голиков на вопрос об опасности трансгенных продуктов ответил: «Никто еще не показал, что это опасно. Но потенциальный риск исключить нельзя, так как мы не знаем отдаленных результатов, т. е. возможны непредвиденные эффекты. Как бы ни была мала их вероятность, но если она не равна нулю, то рано или поздно это событие произойдет. Поэтому разработана Конвенция о биологическом разнообразии, в которой речь идет о необходимости «безопасной передачи, использования и применения любых живых измененных организмов, являющихся результатом биотехнологии и способных оказать неблагоприятное воздействие на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия».

В СанПин 2.3.2.1078-01 указано: «Для пищевых продуктов из генетически модифицированных источников обязательна информация: «генетически модифицированная продукция», или «продукция, полученная из генетически модифицированных источников», или «продукция содержит компоненты из генетически модифицированных источников» (для продуктов, содержащих более 5% компонентов ГМИ). Пищевые продукты, полученные из ГМИ и не содержащие дезоксирибонуклеиновую кислоту и белок, в дополнительном этикетировании не нуждаются в случае полной эквивалентности пищевой ценности продукта традиционному аналогу».

Вопросы для самоподготовки:

1. Какие источники пищи называют генетически модифицированными?
2. Какая информация должна быть указана на этикетках генетически модифицированных продуктов?
3. Какие генетически модифицированные продукты производят в настоящее время?

4. Представляют ли опасность для человека генетически модифицированные продукты?

5. Для какой группы продуктов обязательно указание их происхождения как генетически модифицированных? Почему?

Раздел 7. Медицинская биотехнология

Тема 7.1. Основные задачи биотехнологии в медицине.

Содержание темы:

- Основные задачи, которые решает медицинская биотехнология в медицине (сбор и получение информации: диагностикумы, биосенсоры, использование биотехнологических решений и приемов для получения информации (понятие о биотехнологическом приеме);

- профилактика заболеваний; получение собственно лекарственных средств (технологии получения инсулина, витамина С, витамина D₂, резерпина, биоженшеня).

Медицинские биотехнологии подразделяются на диагностические и лечебные. Диагностические медицинские биотехнологии подразделяются на химические (определение диагностических веществ и параметров их обмена) и физические (определение физических полей организма).

Определение физических полей человеческого организма имеет большое диагностическое значение. Физическая диагностика дешевле и быстрее, чем химическая, поэтому ее роль в будущем будет возрастать.

Раньше диагностические химические биотехнологии сводились к определению в тканях и биологических жидкостях веществ, имеющих диагностическое значение. Назовем этот подход статическим. В настоящее время диагностика использует определение скоростей образования и распада представляющих интерес веществ, а также определение активности ферментов, осуществляющих соответственно синтез и деградацию этих веществ. Назовем этот подход динамическим. И, наконец диагностика стала оценивать влияние на метаболизм диагностических веществ определенных функциональных воздействий. Такой подход можно назвать функциональным. Он позволяет выявить резервные возможности организма. В древности для лечения больных использовали растения и минералы. В последние два столетия широкое распространение получили синтетические химические препараты и антибиотики.

Сравнительно недавно в фармакологии начали использовать индивидуальные биологически активные соединения и составлять их оптимальные композиции, а также использовать специфические активаторы и ингибиторы определенных ферментов. Альтернативой антибиотикам становится вытеснение патогенной микрофлоры сапрофитной микрофлорой (использование микробного антагонизма).

Кроме лекарственных методов лечения в современной медицине используют еще ароматы (аромотерапия), механические воздействия (массаж) и воздействие физических полей (физиотерапия). Физические поля интересны тем, что с их помощью можно лечить самые разные заболевания. Наибольший интерес сейчас вызывают тепловое воздействие, лазерное излучение и КВЧ-излучение (электромагнитное излучение миллиметрового диапазона)

Наиболее актуальными проблемами современной медицины являются борьба с сердечно-сосудистыми заболеваниями (прежде всего с атеросклерозом), с онкологическими заболеваниями, с аллергиями, старением и с вирусными инфекциями (в том числе со СПИДом).

В последнее время появились эффективные средства борьбы с атеросклерозом. Это, прежде всего статины (и появляются все новые и более эффективные средства этого ряда). Считается, что широкое применение этих лекарств должно привести к существенному продлению жизни.

По мнению ряда специалистов, решение проблемы онкологических заболеваний будет достигнуто с помощью иммунологических методов, позволяющих избирательно уничтожать опухолевые клетки. Решение проблемы рака должно повысить среднюю продолжительность жизни. Решение проблем аллергических заболеваний определяется развитием иммунологии и прогрессом в изучении такой фундаментальной проблемы медицины, как воспаление. Человечество еще очень плохо справляется вообще с вирусными инфекциями, а не только со СПИДом. Химиотерапия и антибиотики, позволяющие эффективно бороться с бактериальной инфекцией, не эффективны в отношении вирусов. Предполагается, что существенный прогресс в деле борьбы с вирусными инфекциями будет достигнут за счет развития молекулярной биологии вирусов, в частности изучения взаимодействия вирусов со специфическими для них клеточными рецепторами.

Расшифровка генома человека и успехи в клонировании животных открывают ошеломляющие перспективы в медицине. Однако здесь не все так просто. Мало знать структуру конкретного гена, надо еще знать, как регулируется его активность. Интенсивные работы в области регуляции

активности генома эукариот в сочетании с совершенствованием методов генной инженерии должны обеспечить решающий прогресс в лечении таких заболеваний, как диабет. Использование метода клонирования человека может привести к созданию банка запасных частей для конкретных людей и обеспечить весьма значительное продление их жизни. Однако против этого выдвигаются возражения морального порядка. Представляется, что дилемма будет разрешена с созданием технологий клонирования тканей и органов. Еще одну революцию в медицине вызывает изучение так называемых стволовых клеток, т.е. клеток, которые являются предшественниками других типов клеток, включая нервные.

Понятие о стволовых клетках впервые появилось в России еще в начале прошлого века. Гистолог А.Н. Максимов изучая процесс кроветворения, пришел к выводу о их существовании.

Стволовые клетки могут давать начало любым клеткам организма - и кожным, и нервным, и клеткам крови. Стволовые клетки можно выделять и растить в культуре ткани. Способность давать множество разнообразных клеточных типов делает стволовые клетки важнейшим восстановительным резервом в организме, который используется для замещения дефектов, возникающих в силу тех или иных обстоятельств.

Стволовые клетки способны превращаться в клетки всех типов тканей: клетки крови, внутренних органов, мышечных и костных тканей, кожного покрова, нейроны и др. На ранних стадиях своего развития организм человека практически полностью состоит из стволовых клеток, которые постепенно приобретают специализацию, то есть из них образуются органы и ткани организма. Таким образом, стволовые клетки являются, во-первых, своего рода строительным материалом организма. Также они принимают непосредственное участие в регенеративных процессах организма и могут замедлять процесс старения. Из-за способности к преобразованию в клетки любых органов и тканей стволовые клетки играют роль «скорой помощи»: если где-то в организме неполадка, стволовые клетки направляются туда и заменяют потерянные в результате болезни или повреждения клетки органа, восстанавливают его функции. С возрастом количество стволовых клеток уменьшается, и регенеративные возможности организма снижаются. Использование стволовых клеток - это в перспективе решение проблемы регенерации, т.е. радикального лечения инсульта, инфаркта, восстановления утраченных конечностей и т.п., а также весьма существенное продление жизни.

Представляется, что сейчас лидерами медицинской науки являются медицинская генетика и иммунология. Если биотехнология 20 века

оперировала с отдельными генами и белками, то биотехнология нынешнего столетия - это интеграция генов и белков. К сегодняшнему дню накоплено достаточно много информации о генах и способах их регуляции, изменении их экспрессии при патологических процессах. Разработаны принципиально новые подходы к анализу изменения экспрессии генов при болезнях, что позволяет быстро открывать новые гены, вовлеченные в такие сложные патологии, как рак, диабет и сердечно-сосудистые болезни. Благодаря развитию геномики появились новые возможности выбора конкретных мишеней для действия фармакологических средств.

Особое место занимают системы диагностики, основанные на анализе изменений в экспрессии генов при заболевании, что уже начинают использовать при анализе инфекций, в судебной медицине и др. Выявление механизмов взаимодействия геномов множества патогенов с клетками-хозяевами открывает перспективы создания вакцин нового поколения.

Медицинская генетика может не только предотвращать появление на свет генетически неполноценных детей путем генетического консультирования их родителей и диагностировать генетические заболевания. Ее перспектива-это пересадка генов и управление их активностью.

Иммунология позволяет создавать новые подходы к лечению иммунологических заболеваний (в том числе иммунодефицитов, аутоиммунных заболеваний и аллергии), инфекционных и онкологических заболеваний.

Факт лидерства генетики подтверждается и тем, что Нобелевская премия за 2007 год в номинации «Медицина и физиология» присуждена «за исследования основ введения специфических генетических модификаций в организмы мышей путем использования эмбриональных стволовых клеток». Эта технология получила название нацеленного воздействия на гены (gene targeting). Сегодня она широко используется для «выключения» (isolated), или, как еще говорят, «нокаута», определенного гена. Таким способом можно узнать, какова функция данного гена. Ее разделили между собой американцы Марио Капекки (Гарвардский университет, США), Оливер Смитис (Университет Северной Каролины, США) и британец сэр Мартин Эванс (Кардиффский университет, Великобритания).

Вопросы для самоподготовки:

1. Основные направления медицинской биотехнологии.
2. Биологическая функция стволовых клеток.
3. Современные направления в терапии стволовыми клетками.

4. Антиретровирусные препараты.
5. Успехи в лечении ВИЧ и СПИД.
6. Профилактика заражения ВИЧ.
7. Медицинские репродуктивные технологии.
8. Профилактика заражения ВИЧ новорождённых у ВИЧ+ матерей.
9. Противоопухолевые препараты.

Тестовые задания:

1. Предшественник пенициллина, резко повысивший его выход при добавлении в среду:
 - А. β -диметилцистеин
 - Б. валин
 - +В. фенилуксусная кислота
 - Г. α -аминоадипиновая кислота
 - Д. лазин
2. Предшественник при биосинтезе пенициллина добавляют:
 - А. в подготовительной стадии
 - +Б. в начале ферментации
 - В. на вторые-третьи сутки после начала ферментации
 - Г. каждые сутки в течение 5-суточного процесса
 - Д. только в конце ферментации
3. Превращение карденолида дигитоксина в менее токсичный дигоксин (12-гидроксилирование) осуществляется культурой клеток:
 - А. *Acremonium chrysogenum*
 - Б. *Saccharomyces cerevisiae*
 - +В. *Digitalis lanata*
 - Г. *Tolypocladium inflatum*
 - Д. *Penicillium chrysogenum*
4. Причины высокой эффективности антибиотических препаратов уназин и аугментин заключаются в:
 - А. невысокой токсичности (по сравнению с ампициллином и амоксициллином)
 - Б. невысокой стоимости
 - +В. действии на резистентные к β -лактамам штаммы бактерий
 - Г. пролонгации эффекта
 - Д. расширении антибиотического спектра

5. Свойство новых β -лактамных антибиотиков, наиболее ценное при лечении бактериальных осложнений у больных с ВИЧ-инфекцией:
- А. устойчивость к β -лактамазам
 - Б. слабая токсичность
 - +В. связывание с ПСБ-2
 - Г. связывание с ПСБ-3
 - Д. пролонгированная циркуляция
6. Качество серийного инъекционного препарата пенициллина, проверяемое в медицинской промышленности пенициллиназ β -лактамаз):
- А. токсичность
 - Б. прозрачность
 - +В. стерильность
 - Г. пирогенность
 - Д. стабильность
7. Антибиотикотолерантность патогена обусловлена:
- А. разрушением антибиотика
 - Б. активным выбросом антибиотика
 - +В. низким содержанием автолизина
 - Г. отсутствием мишени для антибиотика
 - Д. конформацией мишени
8. Микобактерии - возбудители современной туберкулезной инфекции - устойчивы к химиотерапии вследствие:
- +А. компенсаторных мутаций
 - Б. медленного роста
 - В. внутриклеточной локализации
 - Г. ослабления иммунитета организма-хозяина
 - Д. быстрого роста
9. Мониторинг (применительно к лекарству) - это:
- А. введение в организм
 - Б. выделение
 - В. выявление в тканях
 - +Г. слежение за концентрацией
 - Д. дозирование
10. Скрининг (лекарств)-это:
- А. совершенствование путем химической трансформации
 - Б. совершенствование путем биотрансформации
 - +В. поиск и отбор («просеивание») природных структур
 - Г. полный химический синтез
 - Д. изменение пространственной конфигурации природных структур

11. Таргет-это:
- А. сайт на поверхности клетки
 - Б. промежуточная мишень внутри клетки
 - +В. конечная внутриклеточная мишень
 - Г. функциональная группа макромолекулы
 - Д. оперон
12. Метициллинорезистентность (MRSA) обусловлена:
- А. появлением капсулы
 - Б. быстротой размножения
 - В. комплексом β -лактамаз
 - +Г. появлением ПСБ-2а с низким сродством к пенициллинам и цефалоспорином, используемым при лечении в клинике
 - Д. активным выбросом
13. При лечении больных СПИДом или при других ситуациях с проявлением пониженной активности иммунной системы предпочтительнее использовать:
- А. ПСБ-1а
 - Б. ПСБ-16
 - +В. ПСБ-2
 - Г. ПСБ-3
 - Д. повышенные дозы антибиотика
14. Конкретная локализация β -лактамаз у грамположительных бактерий:
- +А. вне клетки
 - Б. на рибосомах
 - В. на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны
 - Г. на полюсах клетки
 - Д. в периплазматическом пространстве под пориновыми каналами
15. Конкретная локализация β -лактамаз у грамотрицательных бактерий:
- А. вне клетки
 - Б. на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны
 - В. в цитоплазматическом пространстве равномерно
 - +Г. в периплазматическом пространстве под пориновыми каналами
 - Д. на рибосомах
16. Причина распространения β -лактамаз среди возбудителей в клинике- это частота применения:
- +А. β -лактамных антибиотиков
 - Б. аминогликозидов
 - В. тетрациклиновых антибиотиков
 - Г. макролидов
 - Д. фторхинолонов

17. Конкретный характер зависимости между количеством применяемых антибиотиков и появлением β -лактамаз:

- +А. прямой
- Б. не прямой
- В. обратный
- Г. не имеет значения
- Д. косвенный

18. Антибиотики, способные проникать через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий:

- А. бензилпенициллин
- Б. эритромицин
- +В. ампициллин
- Г. фузидин
- Д. нистатин

Тема 7.2.Получение видоспецифических для человека препаратов.

Содержание темы:

- Методы клеточной инженерии, методы генной инженерии (в том числе получение видоспецифических для человека препаратов интерфероны, интерлейкины, инсулин.

- Производство инсулина
- Актуальность применения интерферонов. Коммерческие препараты интерферонов. Интерфероны, производимые в Новосибирской области
- Продукция предприятия «Вектор» (научноград Кольцово НСО)
- Биологическое значение интерлейкинов
- Сывороточные препараты.

В 1957 г. ученые обнаружили, что клетки, зараженные вирусом, вырабатывают особое вещество, угнетающее размножение как гомологичных, так и гетерологичных вирусов, которое они назвали интерфероном. Если иммунная система обеспечивает белковый гомеостаз и через него устраняет чужеродную генетическую информацию, то система интерферона непосредственно воздействует на чужеродную генетическую информацию, устраняя ее из организма на клеточном уровне, и тем самым обеспечивает нуклеиновый гомеостаз. Система интерферона тесно взаимодействует с иммунной системой. Интерфероны закодированы в генетическом аппарате клетки. Гены для человеческого фибробластного интерферона располагаются во 2-й, 9-й

и длинном плече 5-й хромосомы, а ген, регулирующий транскрипцию - в коротком плече той же хромосомы. Ген, детерминирующий восприимчивость к действию интерферона, локализован в 21-й хромосоме. Ген для α -интерферона располагается в 9-й хромосоме, для γ -интерферона - в 11-й хромосоме.

Система интерферона не имеет центрального органа, так как способностью вырабатывать интерферон обладают все клетки организма позвоночных животных, хотя наиболее активно вырабатывают его клетки белой крови.

Интерферон спонтанно не продуцируется интактными клетками и для образования его нужны индукторы, каковыми могут быть вирусы, бактериальные токсины, экстракты из бактерий и грибов, фитогемагглютинины, синтетические вещества - поликарбоксилаты, полисульфаты, декстраны, но наиболее эффективными индукторами интерферона являются двунитчатые РНК: двунитчатые вирусные РНК и двунитчатые синтетические сополимеры рибонуклеотидов (поли-ГЦ, поли-ИЦ) и др. Индукция интерферона происходит вследствие дерепрессии его генов.

Типы интерферонов. Известны три типа интерферонов человека: α -интерферон, или лейкоцитарный интерферон, который продуцируется лейкоцитами, обработанными вирусами и другими агентами; β -интерферон, или фибробластный интерферон, который продуцируется фибробластами, обработанными вирусами и другими агентами. Оба эти интерферона принадлежат к типу 1. Более сильный γ -интерферон, или иммунный интерферон, принадлежит к типу 2. Имеется несколько подтипов α -интерферона, и общее число их у человека доходит до 25. Сравнительная характеристика интерферонов человека приведена в таблице. Активность интерферонов измеряется в международных единицах (МЕ). Одна единица соответствует количеству интерферона, которое ингибирует репродукцию вируса на 50 %.

При индукции интерферонов синтезируется два и более его типов. Так, при индукции интерферона на лимфобластах образуется 87 % лейкоцитарного и 13 % фибробластного интерферона, при индукции интерферона на фибробластах имеют место обратные соотношения. Между тремя типами интерферонов могут существовать синергические взаимодействия.

Свойства интерферонов. Интерфероны обладают видотканевой специфичностью. Это означает, что интерферон человека действует только в организме человека, но неактивен в организме других биологических видов.

Конечно, барьеры видовой специфичности не абсолютны: интерферон человека проявляет некоторую активность в тканях человекообразных обезьян, а куриный интерферон в организме близких видов семейства куриных. Однако активность интерферона в гетерогенных организмах резко снижается.

Поэтому можно заключить, что интерфероны, появившиеся у позвоночных, эволюционировали вместе с хозяевами. Интерферон является относительно устойчивым белком и хорошо переносит кислую среду (рН 2,2), что используется для выделения его и очистки. Антигенные свойства интерферонов мало выражены, в связи с чем, антитела к нему удается получить лишь после многократных иммунизаций. Интерфероны не обладают специфичностью в отношении вирусов и действуют угнетающе на репродукцию различных вирусов, хотя разные вирусы обладают неодинаковой чувствительностью к интерферону. Чувствительность к нему обычно совпадает с индуцирующей активностью к интерферону. Наиболее часто применяемыми индукторами интерферона и тест-вирусами для его титрования являются рабдовирусы (вирус везикулярного стоматита), парамиксовирусы, тогавирусы. Продукция интерферона зависит также от характера применяемых клеток. Существуют клетки, дефектные по нескольким генам интерферона. Интерфероны оказывают антивирусное, противоопухолевое, иммуномодулирующее и многие другие действия. Наиболее изучено их антивирусное действие, и именно на вирусных моделях выяснены биологические и другие свойства интерферонов. Интерферон оказывает противоопухолевое действие при парентеральном введении в больших дозах, связанное с подавлением им цитопротиперативной активности. Добавление интерферона к культуре нормальных клеток сопровождается уже через 2 ч угнетением в них синтеза ДНК. При вирусиндуцированных опухолях интерферон угнетает репродукцию онковирусов и одновременно подавляет цитопротиперативную активность.

Интерферон является регулятором различных механизмов иммунного ответа, оказывая стимулирующее или угнетающее действие на иммунные реакции.

Механизм действия интерферона. Интерферон связывается с клеточными рецепторами, находящимися на плазматической мембране, что служит сигналом для дерепрессии соответствующих генов. В результате индуцируется синтез особой протеинкиназы PKs, которая присутствует в следовых количествах во всех клетках млекопитающих и активируется

низкими концентрациями двунитчатой РНК, а в зараженных вирусами клетках - вирусными репликативными комплексами.

Протеинкиназа фосфорилирует α-субъединицу иницирующего фактора трансляции eIF-2, и фосфорилирование блокирует активность иницирующего фактора. В результате иРНК, связанная с иницирующим комплексом, не может связаться с большой рибосомальной субъединицей, и поэтому ее трансляция блокируется. Иницирующий фактор eIF-2 в одинаковой степени необходим для трансляции как клеточных, так и вирусных иРНК, однако преимущественно блокируется трансляция вирусных иРНК, связанных с вирусными двунитчатыми РНК-структурами, в результате локальной активации протеинкиназы. В обработанных интерфероном клетках индуцируется синтез фермента - синтетазы, которая катализирует 2,5-олигоадениловую кислоту, переключающую действие клеточных нуклеаз на разрушение вирусных иРНК. Таким образом, вирусные иРНК подвергаются разрушению нуклеазами. Блокирование интерфероном стадии инициации трансляции и разрушение иРНК обуславливают его универсальный механизм действия при инфекциях, вызванных вирусами с разным генетическим материалом.

Применение интерферонов. Интерфероны применяются для профилактики и лечения ряда вирусных инфекций. Их эффект определяется дозой препарата, однако высокие дозы интерферона оказывают токсическое действие. Интерфероны широко применяются при гриппе и других острых респираторных заболеваниях. Препарат эффективен на ранних стадиях заболевания, применяется местно, например путем закапывания или введения с помощью ингалятора в верхние дыхательные пути в концентрациях до $3 \cdot 10^4$ - $5 \cdot 10^4$ ед 2-3 раза в день. При конъюнктивитах интерферон применяют в виде глазных капель. Интерфероны оказывают терапевтическое действие при гепатите В, герпесе, а также при злокачественных новообразованиях. При этих заболеваниях назначают более высокие концентрации. Препарат применяется парентерально - внутривенно и внутримышечно в дозе 105 ед на 1 кг массы тела. Более высокие дозы оказывают побочное действие (повышение температуры, головная боль, выпадение волос, ослабление зрения и т.д.). Интерферон может вызвать также лимфопению, задержку созревания макрофагов, у детей - тяжелые шок-овые состояния, у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями - инфаркт миокарда. Очистка интерферона значительно снижает его токсичность и позволяет применять высокие концентрации. Очистка осуществляется с помощью аффинной хроматографии с использованием моноклональных антител к интерферону.

Генноинженерный интерферон. Генноинженерный лейкоцитарный интерферон получают в прокариотических системах (кишечной палочке). Биотехнология получения интерферона включает следующие этапы:

- 1) обработка лейкоцитарной массы индукторами интерферона;
- 2) выделение из обработанных клеток смеси иРНК;
- 3) получение суммарных комплементарных ДНК (кДНК) с помощью обратной транскриптазы;
- 4) встраивание кДНК в плазмиду кишечной палочки и ее клонирование;
- 5) отбор клонов, содержащих гены интерферона;
- 6) включение в плазмиду сильного промотора для успешной транскрипции гена;
- 7) экспрессия гена интерферона, т.е. синтез соответствующего белка;
- 8) разрушение прокариотических клеток и очистка интерферона с помощью аффинной хроматографии.

Получены высокоочищенные и концентрированные препараты интерферона, которые испытываются в клинике. Человеческий лейкоцитарный интерферон, нативный и концентрированный, предназначен для профилактики и лечения гриппа и других вирусных респираторных заболеваний.

Лейкоцитарный интерферон - видоспецифический белок, синтезируемый лейкоцитами человека в ответ на воздействие вируса-интерфероногена. Интерферон не обладает избирательной противовирусной активностью и действует практически на все вирусы.

Для приготовления интерферона используют лейкоциты свежеполученной донорской крови. Под воздействием вируса - интерфероногена лейкоциты, находящиеся в культуральной среде, синтезируют интерферон. Затем лейкоциты удаляют центрифугированием, вирус инактивируют. Препарат является нативным интерфероном. Для получения концентрированного нативный интерферон дополнительно очищают методом хроматографического разделения на колонках с сефадексом.

Интерферон выпускают в сухом виде в ампулах. Нативный сухой интерферон представляет собой пористый порошок серовато-коричневого цвета, который легко растворяется в дистиллированной воде. Растворенный препарат имеет розовато-красный цвет с опалесценцией. Допускается слабый коричневый оттенок раствора. Концентрированный сухой препарат - пористый порошок серовато-белого цвета, также легко растворяющийся в дистиллированной воде. Раствор препарата имеет сероватый цвет

с опалесценцией, допустим слабый желтовато-коричневый оттенок. Посторонние примеси содержаться не должны. Человеческий лейкоцитарный интерферон выпускают вирусологически и бактериологически стерильным. Противовирусная активность нативного препарата должна быть не менее 32 единиц, концентрированного - 100 единиц. Активность определяется титрованием на первичной культуре клеток кожно-мышечной ткани эмбриона человека с вирусом везикулярного стоматита.

Противопоказаний к применению препарата нет. Интерферон не реактогенен, не вызывает побочных явлений. Препарат хранят при температуре 4 °С. Срок годности 1 год. По истечению его может быть проведен переконтроль в институте, изготовившем данную серию препарата. При сохранении физических свойств и активности срок годности препарата может быть продлен еще на 3 месяца.

Вопросы для самоподготовки:

1. Перечислите основные видоспецифические препараты.
2. Коммерчески названия видоспецифических препаратов.
3. Реимущества видоспецифических препаратов.
4. Лекарственные формы интерферона.
5. Противоклещевой человеческий иммуноглобулин.
6. Генно-инженерный человеческий инсулин.

Тестовые задания:

1. Гибридизация протопластов возможна, если клетки исходных растений обладают:
А. половой совместимостью
Б. половой несовместимостью
+В. совместимость не имеет существенного значения
Г. видоспецифичностью
Д. ферментативной активностью
2. Преимуществом генноинженерного инсулина является:
А. высокая активность
+Б. меньшая аллергенность
В. меньшая токсичность
Г. большая стабильность
Д. высокая чистота продукта

3. Преимущество получения видоспецифических для человека белков путем микробиологического синтеза:
- А. простота оборудования
 - Б. экономичность
 - В. качество сырья
 - +Г. снятие этических проблем
 - Д. стабильность производства
4. Разработанная технология получения рекомбинантного эритропоэтина основана на экспрессии гена:
- А. в клетках бактерий
 - Б. в клетках дрожжей
 - В. в клетках растений
 - +Г. в культуре животных клеток
 - Д. природа клетки не имеет значения
5. Особенностью пептидных факторов роста тканей является:
- А. тканевая специфичность
 - Б. видовая специфичность
 - В. образование железами внутренней секреции
 - +Г. трансформационная активность
 - Д. каталитическая активность
6. Преимущество RIA перед определением инсулина по падению концентрации глюкозы в крови животных:
- А. меньшая стоимость анализа
 - Б. отсутствие необходимости дефицитных реагентов
 - В. легкость освоения
 - +Г. отсутствие влияния на результаты анализа других белков
 - Д. продолжительность времени анализа
7. При оценке качества генноинженерного инсулина требуется уделять особенно большее внимание тесту на:
- А. стерильность
 - Б. токсичность
 - В. аллергенность
 - +Г. пирогенность
 - Д. стабильность

Тема 7.3. Иммунобиотехнология. Моноклональные АТ. Прививочные препараты.

Содержание темы:

- Введение в современную иммунобиотехнологию.

- Естественный и искусственный иммунитет.
- Классификация антител.
- Иммуносенсоры.
- Технология получения иммуноглобулинов. Клеточная инженерия.
- Гибридная технология получения моноклональных антител.
- Современные прививочные препараты.
- Современная классификация вакцинных препаратов.
- Микробные живые вакцины.
- Вирусные живые вакцины.
- Технология получения живых вакцин.
- Убитые вакцины. Технология получения убитых вакцин.

Иммунобиотехнология – новое направление иммунологии, разрабатывающее получение высокоэффективных диагностических и лечебных средств на основе биотехнологии.

В качестве примера иммунобиотехнологического генного процесса может служить получение вируса полиомиелита из культуры ткани живого человека для получения вакцины. Биопродукты (вакцины) должны проходить тщательную проверку на безопасность и эффективность. На эту стадию проверки вакцины уходит обычно около двух третей (2/3) стоимости вакцины.

Вакцины - это препараты, приготовленные из убитых или ослабленных болезнетворных микроорганизмов или их токсинов. Как известно, вакцины применяются с целью профилактики или лечения. Введение вакцин вызывает иммунную реакцию, за которой следует приобретение устойчивости организма человека или животного к патогенным микроорганизмам. Если рассмотреть состав вакцины, то в них входят:

- действующий компонент, представляющие специфические антигены,
- консервант, который определяет стабильность вакцины при ее хранении,
- стабилизатор, который продлевает срок годности вакцины,
- полимерный носитель, который повышает иммуногенность антигена (АГ).

Под иммуногенностью понимают свойство антигена вызывать иммунный ответ.

В роли антигена можно использовать:

1. живые ослабевшие микроорганизмы
2. неживые, убитые микробные клетки или вирусные частицы
3. антигенные структуры, извлеченные из микроорганизма

4. продукты жизнедеятельности микроорганизмов, в качестве которых используют токсины, как вторичные метаболиты.

Классификация вакцин в соответствии с природой специфического антигена:

- живые
- неживые
- комбинированные.

1. Живые вакцины получают

а) из естественных штаммов микроорганизмов с ослабленной вирулентностью для человека, но содержащий полный набор антигенов (в качестве примера можно привести вирус оспы).

б) из искусственных ослабленных штаммов.

в) часть вакцин получают генноинженерным способом. Для получения таких вакцин используют штамм, несущий ген чужеродного антигена, например, вирус оспы со встроенным антигеном гепатита В.

2. Неживые вакцины - это:

а) молекулярные и химические вакцины. При этом молекулярные вакцины конструируют на основе специфического антигена, который находится в молекулярном виде. Эти вакцины могут быть получены и путем химического синтеза или биосинтеза. Примерами молекулярных вакцин являются анатоксины. Анатоксины - это бактериальный экзотоксин, потерявший токсичность в результате длительного воздействия формалина, но сохранивший антигенные свойства. Это дифтерийный токсин, столбнячный токсин, ботулинический токсин.

б) корпускулярные вакцины, которые получают из целой микробной клетки, которая инактивизирована температурой, ультрафиолетовым облучением или химическими методами, например, спиртом.

3. Комбинированные вакцины. Они комбинируются из отдельных вакцин, превращаясь при этом в поливакцины, которые способны иммунизировать сразу от нескольких инфекций. В качестве примера можно назвать поливакцину АКДС, содержащую дифтерийный и столбнячный анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены. Эта вакцина, как известно, широко применяется в детской практике. Рассмотрим подробнее токсины с точки зрения их, как продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

1 группа токсинов - это экзотоксины:

экзотоксины - это белковые вещества, выделяемые клетками бактерий во внешнюю среду. Они в значительной степени определяют болезнетворность

микроорганизмов. Экзотоксины в своем строении имеют два центра. Один из них фиксирует молекулу токсина на соответствующем клеточном рецепторе, второй - токсический фрагмент - проникает внутрь клетки, где блокирует жизненно важные метаболические реакции. Экзотоксины могут быть термолабильны или термостабильны. Известно, что под действием формалина они теряют токсичность, но сохраняют при этом иммуногенные свойства - такие токсины называются анатоксинами.

2 группа токсинов - это эндотоксины. Эндотоксины являются структурными компонентами бактерий, представляя липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Эндотоксины менее токсичны, разрушаются при нагревании до 60-80° С в течении 20 минут. Эндотоксины выходят из клетки бактерий при ее разложении. При введении в организм эндотоксины вызывают иммунный ответ. Получают сыворотку путем иммунизации животных чистым эндотоксином. Однако эндотоксины относительно слабый иммуноген и сыворотка не может обладать высокой антитоксической активностью.

Иммунобиотехнологические препараты:

Вакцины вводятся в организм для профилактики. При такой прививке активизируется иммунная система, вырабатываются антитела лимфоцитами клетками, которые сохраняют в памяти эту способность и при повторном попадании этого же антигена образуют комплекс антиген-антитело, который в свою очередь узнается организмом и утилизируется. Вакцина для профилактики полиомиелита представляет поливалентный препарат из трех ослабленных штаммов вируса полиомиелита. В тоже время половина из всех применяемых в настоящее время вакцин относится к живым вакцинам разного происхождения. Это живые вакцины бактериального происхождения, применяемые для профилактики сибирской язвы, чумы, туберкулеза и др. Это живые вакцины вирусного происхождения, применяемые для профилактики оспы, кори, гриппа, краснухи, полиомиелита и др. Неживые вакцины используются для профилактики а. бактериальных инфекций, таких как:

коклюш, дизентерия, холера, брюшной тиф, сыпной тиф.

б. вирусных инфекций: герпес.

Примеры анатоксинов:

дифтерийный, столбнячный, газовой гангрены, ботулимический.

Классификация вакцин может быть представлена и по виду лекарственной формы:

- инъекционные (жидкие)
- пероральные (таблетки, капсулы, драже)
- ингаляционные (аэрозоли).

Получение вакцин

1. вакцины живые

1.1. живые бактериальные вакцины. В ферментере выращиваются чистые ослабленные культуры. Существует 4 основных стадии получения живых бактериальных вакцин:

- выращивание
- стабилизация
- стандартизация
- лиофильное высушивание.

В этих случаях штаммы продуцентов выращиваются на жидкой питательной среде в ферментере вместимостью до 1-2 м³.

1.2. живые вирусные вакцины. В этом случае вакцины получают путем культивирования штамма в курином эмбрионе или в культурах животных клеток.

2. молекулярные вакцины. Чтобы иметь представление об этом типе вакцин, надо знать, что в этом случае из микробной массы выделяют специфический антиген или экзотоксины. Их очищают, концентрируют. Затем токсины обезвреживают и получают анатоксины. Очень важно, что специфический антиген может быть также получен путем химического или биохимического синтеза.

2. корпускулярные вакцины. Их можно получить из микробных клеток, которые предварительно культивируют в ферментере. Затем микробные клетки инактивируют температурой, или ультрафиолетовым облучением (УФ), или химическими веществами (фенолами или спиртом).

Сыворотки

1. Сыворотки широко используются в случаях профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

2. Сыворотки также используются при отравлении ядами микробов или животных - при столбняке, ботулизме дифтерии (для инактивации экзотоксинов), применяются сыворотки и от яда кобры, гадюки и др.

3. Сыворотки могут быть использованы и для диагностических целей, для создания различных диагностических наборов (например в тестах на определение беременности). В этом случае антитела используются в реакциях образования комплексов с антигенами (антиген (АГ) - антитело

(АТ), когда происходит подтверждение наличия соответствующих антигенов, что может быть использовано в различных реакциях. Профилактическое или лечебное действие сывороток основано на содержащихся в сыворотке антителах (АТ)

Для массового получения сыворотки вакцинируют ослов, лошадей. Сыворотки, которые получают путем иммунизации животных должны быть на контроле по такому показателю, как титр антител у животных, чтобы брать у них кровь в период максимального содержания антител. Из крови животных выделяют плазму крови, затем из плазмы удаляют фибрин и получают сыворотку. Это один способ получения сыворотки. Другой способ получения сыворотки - это из культивируемых животных клеток. При этом возникает проблема стерилизации среды. Стерилизация осуществляется мембранным фильтрованием

Для получения антител берут животных - это могут быть мыши, морские свинки, кролики, куры, овцы, козы, куры, лошади и делают им инъекции антигена. В присутствии стимуляторов иммунного ответа, в сыворотке крови накапливаются специфические антитела. Обычно антитела выделяют из сыворотки в виде гаммаглобулиновой фракции, осаждая сыворотку крови сульфатом аммония, спиртом или полиэтиленгликолем. Эти антитела имеют много примесей белков. Высокоочищенные антитела выделяют с помощью ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии на иммуносорбентах.

Антитела, однородные по структуре и специфичности, производимые в неограниченных количествах называются моноклональными антителами. Способ получения моноклональных антител. Такой способ был предложен в 1975 году учеными Г.Келером и К. Миллштейном. Они вводили антиген в организм мыши и получали активно продуцирующие антитела 0- клетки. Эти клетки могут жить только в организме хозяина, но если соединить иммунную клетку с клеткой опухолевой (эти клетки называют миеломные лимфоциты), то образуются гибридные клетки со свойствами своих предшественников, так как они способны долго жить в искусственных условиях и одновременно синтезировать антитела. Такие клетки называются гибридомами. Существуют методы отбора отдельных клеток, синтезирующих только один тип антител. Такие клетки помещают в культуральную жидкость, где они растут, образуя много родственных «клонов», синтезирующих большое количество антител под названием моноклональных. Отсюда возникает название моноклональные антитела.

Вопросы для самоподготовки:

1. Основа иммунобиотехнологии
2. Вакцины
3. Живые вакцины 2.2. Неживые вакцины 2.3. Комбинированные вакцины
4. Токсины, как продукты жизнедеятельности микроорганизмов (экзотоксины, эндотоксины)
5. Иммунобиотехнологические препараты
6. Получение вакцин
7. Сыворотки
8. Применение сывороток
9. Получение сывороток
10. Проблемы роста животных клеток
11. Процесс культивирования животных клеток
12. Процесс консервирования животных клеток
13. Особенности питательной среды
14. Проблемы стерилизации в иммунобиотехнологии
15. Моноклональные антитела в определении групп крови.
16. Гелевая технология определения групп крови.
17. Это диагностика, профилактика, лечение заболеваний с использованием техники моноклональных антител.

Раздел 8. Имобилизованные биообъекты в биотехнологиях.

Тема 8.1 .Имобилизованные биообъекты в биотехнологиях.

Содержание темы:

- Способы иммобилизации биообъектов в биотехнологии (адсорбция, ковалентное связывание, метод поперечных сшивок, инкапсулирование, иммобилизация путем включения в полимерную структуру).
- Липосомы, наносферы, микросферы, таласферы. Аффинная хроматография.
- Использование иммобилизованных биообъектов в медицинских биотехнологиях и в диагностике различных заболеваний (технологии получения глюкозо-фруктозных сиропов, аминокислот, дигоксина из наперстянки шерстистой;
- глюкозный биосенсор; иммобилизованные биообъекты как лекарственные средства (стрептодеказа, современные шовные и перевязочные материалы, использование микрокапсул в косметологии).

Способы введения препаратов в организм могут быть различны: капсулы, растворимые в кишечном соке, культуры штаммов-продуцентов на пленочной основе, в виде свечей, а при легочных заболеваниях – в виде аэрозолей.

Новым направлением в медицине является использование ферментных препаратов типа «контейнер», изготовление которых стало возможным появлению и совершенствованию методов иммобилизации веществ. Эти препараты представляют собой микросферы с более или менее твердой и проницаемой оболочкой. Назначение этих лекарственных препаратов различное. Первым типом «искусственных клеток» следует назвать микрокапсулы. Фермент, находящийся внутри оболочки, не контактирует с жидкостями и тканями организма, не разрушается протеиназами, не ингибируется, не вызывает иммунного ответа организма. Основное достоинство микрокапсул заключается в том, что их можно имплантировать в нужное место, например в непосредственной близости от опухоли. При этом микрокапсула с соответствующим содержанием будет перерабатывать метаболиты, необходимые для роста опухолевой ткани, и эта ткань не будет развиваться. Капсулы могут содержать микроскопические участки тканей. Например, имеются экспериментальные данные по созданию депо инсулина путем имплантации микрокапсул, содержащих островки Лангерганса, синтезирующие в поджелудочной железе инсулин. Известно, что терапии диабетических заболеваний уделяется много внимания. Имплантация лекарственного начала избавила бы пациентов от ежедневных инъекций инсулина.

Следует учитывать, что микрокапсулы, вводимые в кровь, могут забивать кровеносные сосуды и, следовательно, являться причиной образования тромбов. Однако эффективность микрокапсул при использовании их в виде колонок для диализа в аппарате «искусственная почка» несомненна. При этом объем аппаратов и, соответственно, количество необходимых и очень дорогих растворов резко сокращается. Например, для микрокапсулированной «искусственной почки» требуется колонка объемом всего 30 мл, которая работает почти в 100 раз быстрее обычного аппарата. Развитие такой техники сдерживается пока высокой стоимостью, а также необходимостью использовать уже существующую тоже очень дорогую технику. Вероятно, ферментные реакторы на микрокапсулах будут применяться для деградации недиализуемых материалов. Внутри микрокапсул могут быть включены

магнитные частицы. В этом случае извне подводят магнитное поле и препарат удерживают вблизи органа-мишени.

В ряде случаев используются высокомолекулярные соединения, растворимые в определенных условиях и сохраняющие высокую прочность оболочек в других. Так ведет себя ацетилфталилцеллюлоза, микрокапсулы из которой интактны в желудочном соке и растворяются в кишечнике, освобождая содержимое. Сейчас интенсивно исследуются свойства микрокапсул, стенка которых состоит из оболочек эритроцитов. Содержимое эритроцитов удаляется, а «тень» заполняется ферментом. Серьезные успехи достигнуты при лечении аспарагин-зависимых опухолей препаратами аспарагиназы в оболочках эритроцитов. Используются оболочки и других клеток. Так, описаны лекарственные препараты, включенные в оболочки макрофагов. Последние имеют тенденцию накапливаться в очагах воспалений, а следовательно, могут транспортировать туда как низко-, так и высокомолекулярный лекарственный препарат. Существенной положительной стороной «теней» клеток в качестве носителя является их полная совместимость с организмом пациента, поскольку этот носитель готовят на основе клеток, выделенных из крови пациента, и возвращают их ему же с новым содержимым.

Задача введения лекарственного препарата в клетки может быть решена путем создания контейнеров-переносчиков типа липосом или мицелл. Оболочка липосомы представляет собой однослойную или многослойную поверхность, образованную, в свою очередь, бислойной структурой, созданной соединениями, имеющими два гидрофобных, достаточно протяженных участка и гидрофильную группу. Гидрофобные концы слипаются между собой и образуют пленку, обе стороны которой гидрофильны. Липосома, специфически или неспецифически адсорбировавшись на клетке, может быть поглощена ею путем фагоцитоза, и фермент внутри высвобождается.

Хорошо известно, что протеиназы, расщепляя денатурированные белки, способствуют очищению ран, и следовательно, их заживлению. В этом направлении в клинической практике с помощью иммобилизованных протеиназ сделано многое. В качестве носителей для иммобилизации протеолитических ферментов наиболее употребимы волокнистые материалы на основе целлюлозы, поливинилового спирта, солей альгиновой кислоты, полиамидное и коллагеновое волокно. Готовят нити, в которые при формировании включают фермент и используют их в качестве шовного материала. Сравнительный анализ действия нативных и иммобилизованных протеиназ (в основном химотрипсина, трипсина, коллагеназы) показал, что

уже на 2—4-й день рана очищается от некротических масс и по крайней мере вдвое быстрее наступает грануляция. Убедительные результаты получены при лечении трофических язв, лучевых язв кожи. Особенно эффективны иммобилизованные протеиназы при предоперационной подготовке и после пластических операций. Иммобилизованные протеолитические ферменты с большим успехом применяются в лечении гнойных заболеваний легких и плевры.

Вопросы для самоподготовки:

1. Иммобилизованные биообъекты в медицинских биотехнологиях.
2. Способы иммобилизации биообъектов в медицинских биотехнологиях (адсорбция, ковалентное связывание, метод поперечных сшивок, инкапсулирование, иммобилизация путем включения в полимерную структуру).
3. Липосомы, наносферы, микросферы, таласферы. Аффинная хроматография.
4. Использование иммобилизованных биообъектов в медицинских биотехнологиях и в диагностике различных заболеваний (технологии получения глюкозо-фруктозных сиропов, аминокислот, дигоксина из наперстянки шерстистой;
5. Глюкозный биосенсор;
6. Иммобилизованные биообъекты как лекарственные средства (стрептодеказа, современные шовные и перевязочные материалы, использование микрокапсул в косметологии).

Тестовые задания

1. Для производства ферментов используется метод промышленного культивирования микроорганизмов:
 - а) поверхностное культивирование;
 - б) глубинное культивирование.
2. Химический метод иммобилизации ферментов – это:
 - а) образование ковалентных связей между носителем и ферментом;
 - б) включение ферментов в микрокапсулы;
 - в) включение ферментов в полимерные гели;
 - г) включение фермента в волокна полимера.

3. Сорбент для гель-фильтрационной очистки белков и ферментов:

- а) алюминия оксид;
- б) молселект;
- в) ионообменные смолы;
- г) активированный уголь.

4. Связь, не участвующая в образовании α -спирали из первичной структуры белка:

- а) пептидная связь;
- б) водородная связь;
- в) ионные взаимодействия;
- г) вандер-ваальсовы взаимодействия.

5. В процессе выделения из культуральной среды ферментов и их очистки не используются:

- а) экстракция;
- б) сорбционные процессы;
- в) осаждение;
- г) высаливание.

6. Химическая природа кофермента:

- а) ионы металлов;
- б) витамины;
- в) нуклеотиды;
- г) олигосахариды.

7. Изoeлектрическая точка – это:

- а) рН среды, при котором молекула белка не несет заряда;
- б) рН среды, при котором молекула белка несет максимальный заряд;
- в) РН среды, при котором фермент имеет максимальную активность;
- г) рН среды, при котором фермент теряет активность.

7. Пептидная связь играет ключевую роль в образовании:

- а) первичной структуры белковой молекулы;
- б) вторичной структуры белковой молекулы;
- в) третичной структуры белковой молекулы;
- г) четвертичной структуры белковой молекулы.

Раздел 9. Санитарная и профилактическая биотехнология.

Тема 9.1. Использование, биотестов, биосенсоров и диагностических систем для контроля за воздухом и санитарным состоянием водных стоков.

Содержание темы:

- Использование биосенсоров и диагностических систем для контроля за воздухом и санитарным состоянием водных стоков.
- Основные санитарные показатели для оценки уровня загрязнения окружающей среды.
- Использование биотестов (морские светящиеся бактерии, простейшие тетрахимены, дафнии) для оценки отходов на сапрофитную микрофлору и чистоты водных стоков от химических загрязнений.
- Роль биотехнологии в санитарии и профилактике различных заболеваний.

Исследовать сточные воды на содержание разлагаемых и токсичных веществ можно с помощью микроорганизмов. Для этого отбирают пробы сточных вод. Сначала в каждой пробе определяют концентрацию кислорода, затем в пробы вносят микроорганизмы, живущие в сточных водах. Флаконы с пробами плотно закрывают и спустя 5 суток вновь определяют в каждом сосуде содержание кислорода. В пробах с высокой степенью загрязнения содержится много питательных веществ, следовательно, здесь микроорганизмы потребляют больше кислорода, чем в сосудах с «чистыми сточными водами». Но 5 суток – это слишком продолжительный срок. За это время сильно загрязненные сточные воды успевают поступить в реки в огромных количествах. Значит, необходим более ранний «предупредительный сигнал». Для этого применяются «биосенсоры» – биологические измерительные зонды, которые в течение нескольких минут показывают степень загрязнения сточных вод. Биосенсор – это электрод, соединенный с электронным табло, на котором появляются сведения о содержании кислорода в жидкости.

На поверхности этого электрода наносится тонкий слой микроорганизмов, живущих в сточных водах; микроорганизмы удерживаются при помощи плотного фильтра. Погрузив такой биосенсор в жидкость, можно непосредственно «измерить» дыхание микроорганизмов. В чистой воде микроорганизмы почти не дышат, так как в воде очень мало питательных веществ, а биосенсор подает совсем

слабый сигнал. С помощью таких же биосенсоров можно определять и концентрацию питательных веществ в биореакторе. Существуют биосенсоры, работающие на основе ферментов, полученных из микроорганизмов. Например, прибор с биосенсором, несущим на поверхности своего электрода фермент глюкооксидазу, за 1 ч может с большой точностью определить более чем в 100 пробах крови или мочи, не содержится ли в них повышенное количество сахара.

Вопросы для самоподготовки:

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

Варианты контрольных работ

Вариант 1.

1. Введение в биотехнологию. Возникновение биотехнологии. Специфика биотехнологии. Разделы биотехнологии. Биотехнология и медицина.
2. Живая клетка и ее жизнедеятельность. Генетическая основа жизни. Изменчивость, генетическая рекомбинация – на примере микроорганизмов.
3. Генетика микроорганизмов. Основы генетической и клеточной инженерии.
4. Генная инженерия. Методы генной инженерии.
5. Биообъект, как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических средств.

6. Микроорганизмы, как основной биообъект в биотехнологии.
Принципы селекции микроорганизмов.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. История развития биотехнологии включает следующие периоды

1. Допастеровский
2. Послепастеровский
3. Антибиотиков
4. Антител
5. Управляемого биосинтеза
6. Новой и новейшей биотехнологии

2. Цели создания трансгенных животных

1. Увеличение продуктивности
2. Невосприимчивость к болезням
3. Ксенотрансплантация органов человеку
4. Продукция лекарственных веществ и продуктов лечебного питания

3. Функцией феромонов является

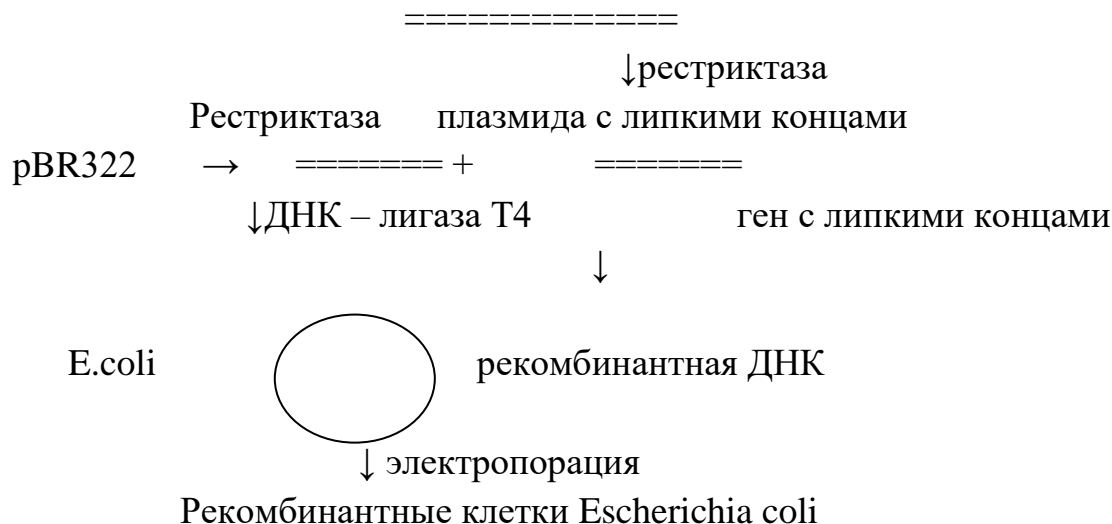
1. Антимикробная активность
2. Противовирусная активность
3. Изменение поведения организма со специфическим рецептором
4. Терморегулирующая активность
5. Противоопухолевая активность

1. Опишите процесс, изображенный на рисунке, по следующей схеме:

- название представленного процесса;
- биообъект, его достоинства и недостатки;
- метод выделения нужного гена, и причины его использования;
- биологические агенты и ферменты, участвующие на каждом этапе генно-инженерных манипуляций;
- вид используемого вектора, его достоинства и недостатки;
- биологическая роль названных ферментов и их функции в биотехнологическом процессе;
- метод введения молекулы ДНК в клетки и его характеристика;
- селективный маркер (ген-маркер), механизм отбора рекомбинантных

Рестриктаза ген с тупыми концами

Лейкоциты человека → ===== + линкеры
↓ ДНК – лигаза T4



Вариант 2.

1. Иммунология.
2. Вакцины, вакцинопрофилактика, получение рекомбинантных вакцин.
3. Иммуноглобулины, лечебные сыворотки, их получение и применение в медицине..
4. Методы изготовления лечебно - профилактических сывороток.
5. Оценка специфической активности сывороточных препаратов.
6. Общая характеристика и требования к сывороткам, выпускаемым для практического применения.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

4. Вектор на основе фаговой ДНК предпочтительнее вектора плазмиды благодаря

1. Меньшей токсичности
2. Большему объему информации
3. Большой частоте включения
4. Отсутствию лизиса клетки хозяина

5. Понятию «биообъект» соответствуют следующие определения

1. Организм, на котором испытываются новые биологически активные вещества
2. Организм, вызывающий контаминацию биотехнологического оборудования
3. Фермент, используемый в аналитических целях
4. Организм, продуцирующий биологически активные соединения

5. Фермент - промышленный биокатализатор

6. Трансверсия - это вид внутригенной мутации, заключающийся

1. В замене пурина на пиримидин
2. В замене пурина на другой пурин
3. В замене пиримидина на другой пиримидин
4. В замене пиримидина на пурин

3. Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса:

«...продуцент *Streptomyces erythreus* обработан многократно рентгеновскими и ультрафиолетовыми лучами, а также азотсодержщими веществами, с селекцией на каждом этапе. Сверхпродуцент помещен в ферментатор на жидкую питательную среду, содержащую крахмал, соевую муку, кукурузный экстракт, хлорид натрия и карбонат кальция. После завершения процесса культивирования целевой продукт извлечен из культуральной жидкости амилоацетатом и реэкстрагирован в водную фазу при $pH=5$...»

Вариант 3.

1. Общие принципы применения сывороток.
2. Характеристика и методы применения отдельных видов лечебно-профилактических сывороток.
3. Интерлейкины, интерфероны – их получение и применение в медицине.
4. Система интерферонов. Интерлейкины.
5. Интерлейкины, интерфероны, получаемые биотехнологическим путем.
6. Экологические аспекты биотехнологии.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

7. Мишенью для химических мутагенов в клетке биообъектов являются

1. ДНК-полимераза
2. РНК-полимераза
3. Рибосома
4. ДНК
5. Информационная РНК

8. Условия сохранения протопластов в клеточной инженерии

1. Гипотоническая среда
2. Наличие в среде полиэтиленгликоля
3. Наличие в среде буферного раствора

4. Гипертоническая среда
5. Низкая температура

9. Фильтры предварительной очистки воздуха устанавливают

1. После компрессора
2. Перед компрессором
3. Перед ферментатором
4. После влагоотделителя

4. Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса:

«...продуцент в начале производственного цикла восстанавливают из состояния анабиоза путем пассажей на жидких и твердых питательных средах. Для накопления биомассы используют питательные среды на основе печеночного бульона с добавлением натрия хлорида, пептона и лактозы. Процесс культивирования микроорганизмов ведут в биореакторах при температуре 37°C в условиях перемешивания и аэрации. Биомассу клеток отделяют от культуральной жидкости, с целью защиты клеток от низкой температуры смешивают с сахарозо-желатиновой смесью с добавлением 30-40% обезжиренного молока и подвергают лиофильной сушке...».

Вариант 4.

1. Роль биотехнологии в защите и оздоровлении биосферы
2. Биологическая очистка стоков.
3. Ферментация. Рост и развитие микроорганизмов.
4. Ферменты, получаемые микробным синтезом. Культивирование микроорганизмов и оценка ферментационного процесса.
5. Строение ферментов. Источники ферментов. Стабилизация и использование ферментов.
6. Классификация питательных сред. Требования к питательным средам (ПС).
- 7.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

10. Целевой продукт - внутриклеточный метаболит. По технологическим параметрам целесообразен процесс биосинтеза

1. Периодический
2. Непрерывный
3. Полупериодический
4. Объемно-доливной

11. Цели применения инженерной энзимологии в производстве лекарственных средств

1. Получение нового лекарственного вещества
2. Получение лекарственных веществ более высокого качества
3. Улучшение технико-экономических показателей производства
4. Расширение спектра действия лекарственных веществ

12. Получение глюкозо-фруктозных сиропов из крахмала основано на использовании ферментов

1. Амилоглюкозидазы
2. Глюкоизомеразы
3. α(альфа)-амилазы
4. β(бетта)-галактозидазы
5. Лактатдегидрогеназы

1. 2. Установите правильную последовательность стадий и операций технологического процесса, заполните недостающие операции стадии «Подготовка и стерилизация питательной среды». Предложите методы и аппаратное оснащение операций «Стерилизация субстрата» и «Охлаждение субстрата».

1. Подготовка биообъекта
2. Подготовка и стерилизация оборудования и коммуникаций
3. Подготовка и стерилизация субстрата
4. Подготовка и стерилизация газового потока
5. Выбор и реализация рецептуры питательной среды
6. Стерилизация питательной среды
7. Охлаждение питательной среды
8. Культивирование биообъекта
9. Выделение целевого продукта
10. Сушка целевого продукта
11. Анализ целевого продукта
12. Фасовка, упаковка, маркировка лекарственной субстанции
13. Биологическая очистка отходов

Вариант 5.

1. Этапы приготовления комплексных и синтетических ПС на производстве. Их компоненты. Этапы приготовления ПС в лабораториях (демонстрация и лабораторная работа).

2. Контроль за качеством приготавливаемых ПС на производстве и в лабораториях (демонстрация и лабораторная работа). Методы стерилизации ПС.
3. Контроль за работой автоклавов: химический, биологический.
4. Химиотерапевтические препараты (ХТП) История развития химиотерапии. Требования к ХТП: антибиотикам, сульфаниламидным и противовирусным препаратам. Классификация антибиотиков.
5. Плесневые грибы, актиномицеты, бактерии - продукты антибиотиков.
6. Требования к антимикробным препаратам. ХТП.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

13. Индукторами реализации тотипотентности клеток и тканей растений являются

1. УФ-облучение
2. Витамины
3. Аминокислоты
4. Фитогормоны
5. Предшественники метаболитов

14. Тип питания культуры тканей растения

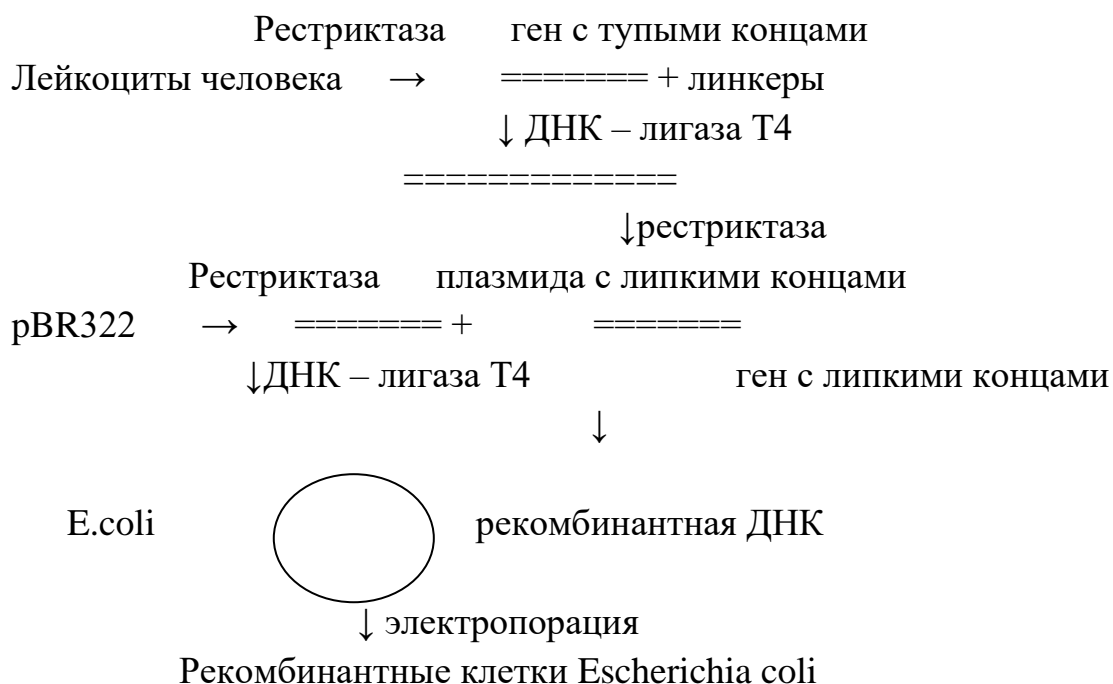
1. Ауксотрофный
2. Хемогетеротрофный
3. Фотоавтотрофный
4. Хемолитотрофный

15. Из культуры ткани Стевии выделяют

1. Диосгенин
2. Аймалин
3. Антоцианы
4. Рутин
5. Шиконин

1. Опишите процесс, изображенный на рисунке, по следующей схеме:
 - название представленного процесса;
 - биообъект, его достоинства и недостатки;
 - метод выделения нужного гена, и причины его использования;
 - биологические агенты и ферменты, участвующие на каждом этапе генно-инженерных манипуляций;
 - вид используемого вектора, его достоинства и недостатки;
 - биологическая роль названных ферментов и их функции в

- метод введения молекулы ДНК в клетки и его характеристика;
- селективный маркер (ген-маркер), механизм отбора рекомбинантных продуцентов.



1. Вирусы, бактерии, как сырье для получения лекарственных препаратов.
2. Химиотерапия вирусных инфекций.
3. Методы определения чувствительности к антибиотикам: диффузия в иле и метод серийных разведений (лабораторная работа).
4. Основы биотехнологии бактериальных препаратов.
5. Структура биотехнологического производства.
6. История создания вакцин. Изучение лечебных профилактических и диагностических препаратов: вакцин, сывороток, антитоксинов, бактериофагов, диагностикумов, эубиотиков (таблицы, демонстрация, лабораторная работа, блок дополнительной информации) Роль качества бактериальных препаратов, изготавливаемых м/б, промышленностью. (лабораторная работа: задача на определение токсигенности дифтерийных бактерий в реакции преципитации в иле).

16. Экстракция каротина из высушенной биомассы осуществляется

1. Подсолнечным маслом
2. Вазелиновым маслом
3. Летучим органическим растворителем

4. Раствором щелочи
5. Раствором кислоты

17. Биосинтез антибиотиков, используемых как лекарственные вещества, усиливается и наступает раньше на средах

1. Богатых источниками азота
2. Богатых источниками углерода
3. Богатых источниками фосфора
4. Бедных питательными веществами

18. Установите соответствие:

Антибиотик

1. Ципрофлоксацин
2. Нистатин
3. Гентамицин
4. Рифампицин

Внутриклеточная мишень

- А) РНК-полимераза
- В) рибосома
- С) эргостеролы ЦПМ
- Д) ДНК-гираза

3. Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса:

«...продуцент *Streptomyces erythreus* обработан многократно рентгеновскими и ультрафиолетовыми лучами, а также азотсодержащими веществами, с селекцией на каждом этапе. Сверхпродуцент помещен в ферментатор на жидкую питательную среду, содержащую крахмал, соевую муку, кукурузный экстракт, хлорид натрия и карбонат кальция. После завершения процесса культивирования целевой продукт извлечен из культуральной жидкости амилоацетатом и реэкстрагирован в водную фазу при $pH=5...$ »

Вариант 7.

2. Классификация вакцинных препаратов.
3. Живые вакцины.
4. Методы получения аттенуированных штаммов (таблица № 1).
5. Убитые вакцины. Этапы получения живых и убитых вакцин (таблица № 2).

6. Химические вакцины. Этапы серийного производства химических вакцин.
7. Антитоксины, особенности их получения.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

19. Механизмы аменсализма

1. Обмен факторами роста
2. Обмен питательными веществами
3. Синтез токсических веществ
4. Поглощение незаменимых питательных веществ
5. Секреция ферментов, разрушающих полимеры клеточной стенки

20. Иммунотоксины - это белковые гибриды, получаемые в результате конъюгации *in vitro*

1. Полипептидных токсинов и иммуноглобулинов
2. Иммуноглобулинов и макрофагов
3. Цитостатиков и антител
4. Антител и пептидных гормонов
5. Антигенов и лимфоцитов

1. История развития биотехнологии включает следующие периоды

1. Допастеровский
2. Послепастеровский
3. Антибиотиков
4. Антител
5. Управляемого биосинтеза
6. Новой и новейшей биотехнологии

4. Определите лекарственную субстанцию по описанию технологического процесса:

«...продуцент в начале производственного цикла восстанавливают из состояния анабиоза путем пассажей на жидких и твердых питательных средах. Для накопления биомассы используют питательные среды на основе печеночного бульона с добавлением натрия хлорида, пептона и лактозы. Процесс культивирования микроорганизмов ведут в биореакторах при температуре 37°C в условиях перемешивания и аэрации. Биомассу клеток отделяют от культуральной жидкости, с целью защиты клеток от низкой температуры смешивают с сахарозо-желатиновой смесью с добавлением 30-40% обезжиренного молока и подвергают лиофильной сушке...».

Вариант 8.

6. Ассоциированные вакцины. Контроль качества, принципы конструирования.
7. Этапы создания искусственных антигенов.
8. Генно-инженерные вакцины. Лабораторная работа: изучение вакцины против гепатита В «Энджерикс».
9. Рибосомальные вакцины.
10. ДНК-вакцины.
11. Антиидеотические вакцины.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

2. Цели создания трансгенных животных

1. Увеличение продуктивности
2. Невосприимчивость к болезням
3. Ксенотрансплантация органов человеку
4. Продукция лекарственных веществ и продуктов лечебного питания

3. Функцией феромонов является

1. Антимикробная активность
2. Противовирусная активность
3. Изменение поведения организма со специфическим рецептором
4. Терморегулирующая активность
5. Противоопухолевая активность

4. Вектор на основе фаговой ДНК предпочтительнее вектора плазмиды благодаря

1. Меньшей токсичности
2. Большему объему информации
3. Большой частоте включения
4. Отсутствию лизиса клетки хозяина

6. 2. Установите правильную последовательность стадий и операций технологического процесса, заполните недостающие операции стадии «Подготовка и стерилизация питательной среды». Предложите методы и аппаратное оснащение операций «Стерилизация субстрата» и «Охлаждение субстрата».

1. Подготовка биообъекта
2. Подготовка и стерилизация оборудования и коммуникаций
3. Подготовка и стерилизация субстрата
4. Подготовка и стерилизация газового потока
5. Выбор и реализация рецептуры питательной среды
6. Стерилизация питательной среды

7. Охлаждение питательной среды
8. Культивирование биообъекта
9. Выделение целевого продукта
10. Сушка целевого продукта
11. Анализ целевого продукта
12. Фасовка, упаковка, маркировка лекарственной субстанции
13. Биологическая очистка отходов

Вариант 9.

5. Гормоны, выделенные из органов и тканей макроорганизма.
6. Экзогенные иммуномодуляторы.
7. Диагностические препараты: диагностимуляторы, моноклональные антитела для РИА и ИФА, зонды нуклеиновых кислот для выявления РНК- и ДНК- содержащих вирусов.
8. Основы биотехнологии бактериальных препаратов.
9. Структура биотехнологического производства.
10. История создания вакцин. Изучение лечебных профилактических и диагностических препаратов: вакцин, сывороток, антитоксинов, бактериофагов, диагностикумов, эубиотиков (таблицы, демонстрация, лабораторная работа, блок дополнительной информации) Роль качества бактериальных препаратов, изготавливаемых м/б, промышленностью. (лабораторная работа: задача на определение токсигенности дифтерийных бактерий в реакции преципитации в иле).

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

5. Понятию «биообъект» соответствуют следующие определения

1. Организм, на котором испытываются новые биологически активные вещества
2. Организм, вызывающий контаминацию биотехнологического оборудования
3. Фермент, используемый в аналитических целях
4. Организм, продуцирующий биологически активные соединения
5. Фермент - промышленный биокатализатор

6. Трансверсия - это вид внутригенной мутации, заключающийся

1. В замене пурина на пиримидин
2. В замене пурина на другой пурин
3. В замене пиримидина на другой пиримидин
4. В замене пиримидина на пурин

7. Мишенью для химических мутагенов в клетке биообъектов являются
7. ДНК-полимераза
8. РНК-полимераза
9. Рибосома
10. ДНК
11. Информационная РНК

12.2. Установите правильную последовательность стадий и операций технологического процесса, заполните недостающие операции стадии «Подготовка и стерилизация питательной среды». Предложите методы и аппаратное оснащение операций «Стерилизация субстрата» и «Охлаждение субстрата».

1. Подготовка биообъекта
2. Подготовка и стерилизация оборудования и коммуникаций
3. Подготовка и стерилизация субстрата
4. Подготовка и стерилизация газового потока
5. Выбор и реализация рецептуры питательной среды
6. Стерилизация питательной среды
7. Охлаждение питательной среды
8. Культивирование биообъекта
9. Выделение целевого продукта
10. Сушка целевого продукта
11. Анализ целевого продукта
12. Фасовка, упаковка, маркировка лекарственной субстанции
13. Биологическая очистка отходов

Контрольные вопросы для сдачи зачёта с оценкой

1. Основные биообъекты биотехнологии: микроорганизмы, клетки и ткани растений, животных и человека, биокатализаторы.
2. Характеристика различных видов биотехнологической продукции (мировой объем производства в натуральном и денежном выражении) и ее основные потребители.
3. Методы конструирования продуцентов биологически активных веществ: селекция, метод рекомбинантных ДНК, гибридная технология.
4. Сырьевая база биотехнологии.
5. Типовые технологические приемы и особенности культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений, животных и человека.

6. Типовые технологические приемы и аппаратное оформление: стадий культивирования (биосинтеза), поддержания асептических условий, температуры, pH среды и др. параметров процесса на требуемом уровне, тепло- и массообмена.
7. Тестирование биологически активных веществ по типовым схемам, надежности процесса, охраны окружающей среды, контроля и безопасных условий эксплуатации.
8. Вспомогательные стадии технологического процесса и их роль в биотехнологическом производстве.
9. Современные подходы к созданию ресурсо- и энергосберегающих технологий и малоотходных производств.
10. Производство белка одноклеточных организмов. Проблемы и перспективы.
11. Многотоннажное микробиологическое производство ферментных препаратов различного назначения.
12. Микробиологическое производство индивидуальных органических кислот различного назначения.
14. Микробиологическое производство антибиотиков различных классов.
15. Микробиологическое производство витаминов.
16. Микробиологическое производство возобновляемых источников энергии.
17. Производство тепла аэробным окислением органических веществ.
18. Бактериальное выщелачивание химических элементов из руд, концентратов и горных пород.
19. Биологическая характеристика проблем охраны и восстановления окружающей среды.
20. Микробиологическое производство антибиотиков кормового назначения. Микробиологическое производство концентратов витаминов кормового назначения.
21. Производство премиксов.
22. Производство пробиотиков для животноводства.
23. Производство микробных препаратов для растениеводства: для защиты растений от вредных насекомых; антибиотиков против корневой гнили и мучнистой росы; бактериальных удобрений; стимуляторов роста растений гормональной природы
24. Достижения биотехнологии в области создания свободного от вредной микрофлоры посадочного материала (рассады) и трансгенных растений. Проблемы и перспективы.
25. Продукция микробиологического синтеза для пищевой промышленности: производство препаратов ферментов (ренниноподобных протеиназ, глюкоизомеразы, бета-галактозидазы, бета-фруктофуранозидазы).

- 26.Профилактика заболеваний: получение собственно лекарственных средств (технологии получения инсулина, витамина С, витамина D2, резерпина, биоженъшеня).
- 28.Условия работы биообъектов в биотехнологических системах (биотехнологический процесс с начала и до конца обеспечивается биообъектом (на примере технологий получения витамина B12, рибофлавина, стрептокиназы, антибиотиков);
- 29.Генетический контроль за функционированием биообъектов.
- 30.Иммобилизованные биообъекты в биотехнологиях. Липосомы, наносферы, микросферы, таласферы. Аффинная хроматография.
31. Иммобилизованные биообъекты как лекарственные средства (стрептодеказа, современные шовные и перевязочные материалы, использование микрокапсул в косметологии).
32. Структура антител. Классификация антител. Технология получения противокоревого g-глобулина.
- 34.Введение в современную иммунобиотехнологию. Клеточная инженерия. Гибридная технология получения моноклональных антител.
- 35.Технология получения живых вакцин.
- 36.Технология получения убитых вакцин.
- 37.Препараты на основе живых культур микроорганизмов.
- 38.Роль нормальной микрофлоры кишечника в функционировании организма. Технология получения препаратов нормофлоров и пробиотиков.
- 39.Санитарная и профилактическая биотехнология.
- 40.Основные санитарные показатели для оценки уровня загрязнения окружающей среды. Использование биотестов.

СПИСОК ОСНОВНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

СПИСОК ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

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

1. 3.2. Информационное обеспечение

1. Презентационные материалы по всему курсу.

2. Интернет-ресурсы:

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

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

ГЛОССАРИЙ

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

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

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

Амплификация – увеличение количества ДНК, числа копий генов.

Анаэробное брожение – процесс разложения субстрата анаэробными микроорганизмами.

Антагонизм – эффект взаимного подавления действия веществ или процессов.

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

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

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

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

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

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

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

Бактериофаги (фаги) - вирусы, поражающие бактерии.

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

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

Библиотека генома – коллекция произвольно клонированных фрагментов геномной ДНК.

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

неблагоприятных экологических последствий и непосредственной угрозы здоровью людей.

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

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

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

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

Биоэнергетика – наука о закономерностях преобразования энергии в процессах жизнедеятельности организмов

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

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

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

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

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

Гаметы – половые клетки с гаплоидным набором хромосом.

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

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

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

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

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

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

Геном – совокупность гаплоидного набора хромосом данного вида организмов.

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

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

Генотип – совокупность всех генов, локализованных в хромосомах организма.

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

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

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

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

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

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

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

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

Диплоид – организм с двумя гомологичными наборами хромосом ($2n$)
Дифференциация – возникновение функциональных и структурных отличий у различных клеток и тканей организма в процессе его развития.

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

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

Зигота - оплодотворенная яйцеклетка.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Криосохранение – замораживание клеток и тканей растений в жидком азоте при температуре – 1960 С с целью длительного хранения с последующим оттаиванием и получением регенерантов.

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

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

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

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

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

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

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

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

Микориза – симбиоз мицелия гриба и корней высшего растения

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

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

Митоз – процесс непрямого деления эукариотических соматических клеток.

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

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

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

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

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

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

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

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

Пассирование – перенос части каллуса на свежую питательную среду.

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

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

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

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

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

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

Промотор – участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

Пролиферация – новообразование клеток и тканей путем размножения.

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

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

Редупликация – процесс точного самовопроизведения молекул нуклеиновых кислот.

Рекомбинантный ген – ген, состоящий из компонентов различных генов.

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

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

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

Синергизм – эффект взаимного усиления действия веществ или процессов

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

In vivo – культивирование организма в естественных условиях.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Структура и трудоёмкость дисциплины "Прикладная биотехнология"	5
Объём дисциплины и виды учебной работы	5
Структура самостоятельной работы по дисциплине "Современные проблемы и методы биотехнологии"	5
Балльная структура оценки	9

Раздел 1 Предмет прикладной биотехнологии

Тема 1.1 Основные направления и методы биотехнологии. Современное состояние и перспективы развития биотехнологии	10
--	----

Раздел 2 Современные проблемы и методы биотехнологии

Тема 2.1 Генетическая и клеточная инженерия.	13
Тема 2.2. Биотехнология и новейшие генетические методы диагностики. Генетическое и физическое картирование генома	19

Раздел 3 Промышленная и экологическая биотехнология

Тема 3.1.Биообъект промышленные биотехнологии	22
Тема 3.2 Биотехнологические процессы очистки воздуха и воды	26

Раздел 4 Современные достижения биотехнологии в сельском хозяйстве

Тема 4.1. Микробиологическое производство антибиотиков, витаминов, премиксов кормового назначения.....	31
Тема 4.2.Биотехнологические методы в растениеводстве	37
Тема 4.3.Препараты на основе живых культур микроорганизмов. Применение в животноводстве.	40

Раздел 5 Биотехнологические методы консолидации и размножения генотипов выдающихся животных

Тема 5.1.Биотехнология в воспроизводстве животных.	41
Тема 5.2. Молекулярно-генетические маркёры MAS-селекция.	43
Тема 5.3. Трансгенные животные в сельском хозяйстве	45

Раздел 6. Пищевая биотехнология.

Тема 6.1. Продукция микробиологического синтеза для пищевой промышленности	48
Тема 6.2. Генномодифицированные продукты питания	53

Раздел 7 Медицинская биотехнология

Тема 7.1. Основные задачи биотехнологии в медицине	55
Тема 7.2. Получение видоспецифических для человека препаратов.	62
Тема 7.3. Иммунобиотехнология. Моноклональные АТ. Прививочные препараты.	68

Раздел 8 Иммобилизованные биообъекты в биотехнологиях

Тема 8.1 .Иммобилизованные биообъекты в биотехнологиях.	74
---	----

Раздел 9 Санитарная и профилактическая биотехнология

Тема 9.1.Использование, биотестов, биосенсоров и диагностических систем для контроля за воздухом и санитарным состоянием водных стоков.	79
Варианты контрольных работ	80
Список основной литературы	94
Список дополнительной литературы	94
Глоссарий	99
Содержание	108

Составитель
Себежко Ольга Игоревна

ПРИКЛАДНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Методические указания по выполнению самостоятельной и контрольной
работ

Формат 60x84 1/16 6,8 усл. печ. л.

В авторской редакции
Компьютерная вёрстка О.И. Себежко