

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Сельскохозяйственная биотехнология

Направление подготовки (специальность) «Зоотехния»

Профиль образовательной программы «Кормление животных и технология кормов.  
Диетология»

Форма обучения очная

## СОДЕРЖАНИЕ

- 1. Конспект лекций .....**
  - 1.1 Лекция № Л 1 Основы молекулярной биологии
  - 1.2 Лекция № Л 2 Объекты биотехнологии
  - 1.3 Лекция № Л 3 Основы генетической инженерии
  - 1.4 Лекция № Л 4 Биотехнология в животноводстве
  - 1.5 Лекция № Л 5 Биотехнология в животноводстве
  - 1.6 Лекция № Л 6 Биотехнология кормовых препаратов для сельскохозяйственных животных
  - 1.7 Лекция № Л 7 Биотехнология кормовых препаратов для сельскохозяйственных животных
  - 1.8 Лекция № Л 8 Применение достижений современной биотехнологии в агропромышленном производстве
- 2. Методические указания по выполнению лабораторных работ .....**
  - 2.1 Лабораторная работа № ЛР 1 Трансформация бактерий *E. Coli* плазмидной ДНК
  - 2.2 Лабораторная работа № ЛР 2 Трансформация дрожжей плазмидной ДНК
  - 2.3 Лабораторная работа № ЛР 3 Осаждение нуклеиновых кислот этанолом или изопропанолом
  - 2.4 Лабораторная работа № ЛР 4 Определение количества двунитевой ДНК по флуоресценции БЭ
  - 2.5 Лабораторная работа № ЛР 5 Гель-электрофорез
  - 2.6 Лабораторная работа № ЛР 6 Рестриктивный анализ ДНК
  - 2.7 Лабораторная работа № ЛР 7 Полимеразная цепная реакция
  - 2.8 Лабораторная работа № ЛР 8 Полимеразная цепная реакция
  - 2.9 Лабораторная работа № ЛР 9 Методика трансплантации эмбрионов
  - 2.10 Лабораторная работа № ЛР 10 Методика трансплантации эмбрионов
  - 2.11 Лабораторная работа № ЛР 11 Искусственное осеменение с.-х. животных
  - 2.12 Лабораторная работа № ЛР 12 Клонирование
  - 2.13 Лабораторная работа № ЛР 13 Методы оплодотворения яйцеклеток вне организма животного
  - 2.14 Лабораторная работа № ЛР 14 Биотехнология кормовых препаратов
  - 2.15 Лабораторная работа № ЛР 15 Биотехнология кормовых препаратов

# 1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

## 1.1 Лекция № 1 (2 часа)

Тема: Основы молекулярной биологии

### 1.1.1 Вопросы лекции:

1. Возникновение молекулярной биологии
2. Исследование ДНК
3. Репликация ДНК
4. Репарация ДНК
5. Рекомбинация

### 1.1.2 Краткое содержание вопросов

#### 1. Возникновение молекулярной биологии

История биологии исследует развитие биологии - науки, изучающей фундаментальные (наиболее общие) свойства и законы эволюционного развития живых существ. Предметом истории биологии являются выявление и обобщённый анализ основных событий и тенденций в развитии биологического знания.

До XIX века зоология, ботаника, анатомия и физиология были частью «пакета знаний», называвшегося «натуральная философия» и соединявшего позитивные сведения о природных явлениях с умозрительными фантазиями и ошибочными заключениями о причинах этих явлений. История биологии как самостоятельной науки оформляется в XIX веке с появлением эволюционной биологии и клеточной теории.

В XX веке жизнь стала активно изучаться не только на клеточном уровне (и всего организма), но также на молекулярном, и на уровне популяций, сообществ, и экосистем. Появились синтетическая теория эволюции, молекулярная биология, и теория стресса. Но количество нерешённых проблем биологии по-прежнему велико, и это стимулирует деятельность биологов по дальнейшему развитию данной науки.

#### 2. Исследование ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - один из двух типов нуклеиновых кислот, обеспечивающих хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов. Основная роль ДНК в клетках - долговременное хранение информации о структуре РНК и белков.

Расшифровка структуры ДНК(1953 г.) стала одним из поворотных моментов в истории биологии. За выдающийся вклад в это открытие Фрэнсису Крику, Джеймсу Уотсону, Морису Уилкинсу была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине 1962 г.

ДНК тестирование является мощным способом идентификации. Применяя современную технологию определения ДНК, можно идентифицировать индивидуальность со 100% точностью, но идентификация не всегда была настолько точной. До возникновения ДНК диагностики, наука использовала другие биологические методы для идентификации людей и определения родственных отношений между ними. Эти методы включали определение типов крови, серологическое тестирование, тестирование HLA и ,в основном, использовались для определения доноров крови и уменьшения отторжимости донорских органов при операциях по трансплантации органов.

С разработкой ДНК диагностики в 70-х и 80-х годах, ученые получили сильное орудие для идентификации и установления биологического родства. С применением новейших методов, мы можем определять родство и идентифицировать человека со 100% точностью.

В середине 1980-х была разработана технология, названная "полиморфизм длины рестрикционных фрагментов." (или RFLP). Этот метод стал первым генетическим тестом с использованием ДНК. Метод позволял ученым выделять определенные участки ДНК,

выделенные из собранных образцов крови. Для определения отцовства эти уникальные секции ДНК сравнивались. Половина ДНК ребенка должна была соответствовать ДНК матери, а другая половина - соответствовать отцовской ДНК, если ребенок имел биологическое отношение к ним обоим. Но иногда во время подобной процедуры проверки, ДНК ребенка не соответствовал родительским ДНК, возможно из-за генетических мутаций. В этом случае, ученым приходилось проводить статистический анализ для определения возможностей "мутирования". Эта технология давала довольно высокие результаты, почти 99%, но в настоящее время почти не используется, поскольку требует образцы крови от всех участников и очень длительного времени проверок.

Начатый разрабатываться в 80-х годах, метод ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (polymerase chain reaction - PCR) стал стандартным тестом для установления отцовства в 1990-х.

PCR - это технология, при которой образцы фрагментов ДНК копируются и репродуцируются много раз, пока не создаются миллиарды копий, поэтому требуются очень небольшие образцы ДНК из любой части тела (слюна, волосы, ногти, кусочки кожи и т.д.). В дополнение, процесс генетического анализа очень быстрый и в лабораторных условиях занимает несколько часов. С использованием этой технологии PCR, тесты на установление отцовства и другие ДНК анализы выполняются легко и надежно. При стандартном анализе на установление отцовства, образцы ДНК собираются путем соскребания с внутренней стороны щеки у ребенка, отца и, при необходимости, матери. Из этих образцов выделяется ДНК, реплицируется через PCR и сравнивается на сходность. Поскольку половина ДНК ребенка наследуется от матери, а другая половина — от отца, ДНК ребенка должна совпадать с участками обеих биологических родителей.

### 3. Репликация ДНК

Репликация (от лат. *replicatio* - возобновление) - процесс синтеза дочерней молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты на матрице родительской молекулы ДНК. В ходе последующего деления материнской клетки каждая дочерняя клетка получает по одной копии молекулы ДНК, которая является идентичной ДНК исходной материнской клетки. Этот процесс обеспечивает точную передачу генетической информации из поколения в поколение. Репликацию ДНК осуществляет сложный ферментный комплекс, состоящий из 15—20 различных белков, называемый реплисомой (англ.).

### 4. Репарация ДНК

Репарация (от лат. *reparatio* - восстановление) - особая функция клеток, заключающаяся в способности исправлять химические повреждения и разрывы в молекулах ДНК, поврежденной при нормальном биосинтезе ДНК в клетке или в результате воздействия физических или химических агентов. Осуществляется специальными ферментными системами клетки. Ряд наследственных болезней (напр., пигментная ксеродерма) связан с нарушениями систем репарации.

### 5. Рекомбинация

Генетическая рекомбинация включает несколько связанных между собой процессов, в результате которых в клетках или организмах, где они происходят, создаются новые комбинации элементов носителей генетической информации. Рекомбинация между близко расположенными гомологичными хромосомами приводит к интенсивной перетасовке отцовских и материнских генов в ходе мейоза и тем самым создает предпосылки для эволюционной проверки новых комбинаций этих генов в потомстве. Как правило, рекомбинационные события, происходящие в соматических клетках либо во время репликации ДНК, либо после нее и проявляющиеся в виде обмена сестринских хроматид, не приводят к изменению генотипа или фенотипа клетки. Однако нередко они порождают различные геномные перестройки. Это, например, утрата, приобретение или

амплификация генетических элементов и установление новых взаимосвязей между уже имеющимися, но по-новому расположенными элементами.

Если использовать молекулярные термины, то можно сказать, что генетическая рекомбинация состоит в образовании ковалентных связей между нуклеотидными последовательностями из разных областей одной и той же или разных молекул ДНК.

Все клетки и многие вирусы содержат информацию о синтезе ферментов, предназначенных не только для репарации повреждений в собственной ДНК, но и ферментов, осуществляющих рекомбинацию. На самом деле некоторые ферменты, участвующие в репликации и репарации ДНК, играют ключевую роль и при рекомбинации. В этом разделе мы рассмотрим механизмы некоторых рекомбинационных процессов и ферменты, которые их катализируют. Особое внимание будет обращено на рекомбинацию у бактерий и фагов, поскольку у них эти процессы довольно хорошо изучены. Несмотря на то что генетические и морфологические аспекты рекомбинации в эукариотических клетках известны, на молекулярном уровне здесь многое остается неясным.

## 1.2 Лекция № 2 (2 часа)

Тема: Объекты биотехнологии

### 1.2.1 Вопросы лекции:

1. Системы используемые в биотехнологии
2. Прокариотические системы
3. Эукариоты

### 1.2.2 Краткое содержание вопросов

#### 1. Системы используемые в биотехнологии

Объектами биотехнологии являются вирусы, бактерии, грибы – микромицеты и макромицеты, протозоинные организмы, клетки (ткани) растений, животных и человека, некоторые биогенные и функционально сходные с ними вещества (например, ферменты, простагландины, лектины, нуклеиновые кислоты и др.). Следовательно, объекты биотехнологии могут быть представлены организованными частицами (вирусы), клетками (тканями) или их метаболитами (первичными, вторичными). Даже при использовании биомолекулы как объекта биотехнологии исходный биосинтез ее осуществляется в большинстве случаев соответствующими клетками. В этой связи можно сказать, что объекты биотехнологии относятся либо к микробам, либо к растительным и животным организмам. В свою очередь организм можно образно характеризовать как систему экономного, сложнейшего, компактного, саморегулируемого и, следовательно, целенаправленного биохимического производства, устойчиво и активно протекающего при оптимальном поддержании всех необходимых параметров. Из такого определения следует, что вирусы не являются организмами, но по содержанию молекул наследственности, приспособляемости, изменчивости и некоторым другим свойствам они относятся к представителям живой природы.

Как видно из приводимой схемы, объекты биотехнологии исключительно разнообразны, диапазон их распространяется от организованных частиц (вирусов) до человека.

Вирусы занимают положение между живой и неживой природой, у них нет ядра, хотя имеется наследственный ядерный материал – рибонуклеиновая кислота (РНК) или дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК).

В отличие от микробов клеточной организации РНК и ДНК в вирусных частицах вместе никогда не обнаруживаются.

В настоящее время большинство объектов биотехнологии составляют микробы, относящиеся к трем надцарствам (безъядерные, предъядерные, ядерные) и пяти царствам (вирусы, бактерии, грибы, растения и животные). Причем первые два надцарства состоят исключительно из микробов, тогда как третье — преимущественно из растений и животных.

В первой половине XIX в. было сделано одно из самых основных обобщений биологии – клеточная теория (М. Шлейден, Т. Шванн, Р. Вирхов), которая стала общепризнанной. Она же оказалась фундаментом науки – цитология (от греч. *kitos* – полость). Из всех объектов биотехнологии лишь вирусы, вирионы и биомолекулы не имеют клеточной организации. Однако вирусы, находясь в клетках, ведут себя как живые существа – они реплицируются («размножаются») и их генетический материал функционирует, в основном, по общим законам, присущим клеткам любого происхождения. По мере совершенствования методов и техники цитологических исследований ученые глубже проникают в сущность организованных частиц и клеток, а в результате такого проникновения удается обосновать принадлежность всех живых существ к трем надцарствам: *Acaryotae* – безъядерные, *Procaryotae* – предъядерные и

Eucaryotae – ядерные (от греч. а – нет, pro – до, ей – хорошо, полностью, karyon – ядро). К первому относятся организованные частицы – вирусы и вирионы, ко второму – бактерии, к третьему – все другие организмы (грибы, водоросли, растения, животные).

## 2. Прокариотические системы

Среди прокариотических бесклеточных белоксинтезирующих систем наибольшее распространение получили системы на основе экстрактов клеток *E. coli*. Прокариотическая, как и любая другая бесклеточная система биосинтеза белка, должна содержать несколько обязательных компонентов: 1) рибосомы и белковые факторы трансляции; 2) матричный полирибонуклеотид (мРНК или синтетические полинуклеотиды); 3) аминокислотилированные тРНК; 4) GTP в качестве источника энергии; 5) одновалентные ( $K^+$  или  $NH_4^+$ ) и двухвалентные ( $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ ) катионы, а также буферные вещества для поддержания pH системы в физиологических пределах.

Одним из наиболее важных условий функционирования бесклеточных систем биосинтеза белка является нативное состояние рибосом и факторов трансляции. В качестве источников этих компонентов в бактериальных бесклеточных системах чаще всего используют экстракты соответствующих клеток. Бактериальные клетки выращивают на богатой питательной среде, суспендируют в буфере и разрушают тем или иным способом. Лизат центрифугируют при 30 000 g. При этом в супернатанте (так называемом S30-экстракте) остаются рибосомы и остальные белковые факторы трансляции, необходимые для функционирования системы. Кроме того, в нем содержатся бактериальные ДНК и мРНК, которые, если от них не освободиться, приводят к неспецифическому синтезу белка в бесклеточной системе.

3. Эукариоты - (от греч. eu - хорошо, полностью и karyon - ядро), организмы, клетки к-рых содержат оформленные ядра (ядерные). К Э. относятся все высшие животные и растения, а также одноклеточные и многоклеточные водоросли, грибы и простейшие. Ядерная ДНК у Э. заключена в хромосомах, обычно не кольцевидная, соединена с гистонами и, как правило, образует серию клубочков вокруг октомеров гистонов - нуклеосом. Э. обладают ограниченными мембраной клеточными органоидами (иногда с собственной ДНК) - хлоропластами, митохондриями и др. В систематике Э. выделяют в надцарство (Eucaryota) и противопоставляют прокариотам. ЭУМЕТАЗОИ, настоящие многоклеточные (Eumetazoa), подраздел подцарства многоклеточных животных. Термин предложен О. Бюкли в 1910. У Э., как правило, есть кишечник и ротовое отверстие, органы построены из тканей. Включают 2 раздела. Для лучистых, или радиальных (Radialia), характерны радиальная симметрия тела, наличие у взрослых форм двух клеточных слоев - эктодермы и энтодермы, одна полость - кишечная. К этому разделу относятся 2 типа: книдарии и гребневики (иногда оба типа объединяются старым назв.- кишечнополостные; некоторые зоологи неправильно называют кишечнополостными только книдарии). Билатеральные, или двусторонне-симметричные (Bilateria), обладают двусторонней симметрией тела и тремя зародышевыми листками, которые у взрослых не сохраняются. В этот раздел входят 2 подраздела: первичноротые, к к-рым относят сколецид, трохофорных животных, иногда и щупальцевых, и вторичноротые, к к-рым, кроме иглокожих, полухордовых и хордовых, иногда относят щетинкочелюстных и погонофор. Существуют и др. системы.

### 1.3 Лекция № 3 (2 часа)

Тема: Основы генетической инженерии

#### 1.3.1 Вопросы лекции:

1. Молекулярная биология - фундамент генетической инженерии
2. Конструирование рекомбинантных ДНК
3. Выделение генов
4. Экспрессия генов

#### 1.3.2 Краткое содержание вопросов

##### 1. Молекулярная биология - фундамент генетической инженерии

В соответствии с учебным планом подготовки врачей с 1 сентября 2005 года в медицинских ВУЗах Украины введен спецкурс «Современные проблемы молекулярной биологии». Необходимыми предпосылками введения новой для студентов – медиков дисциплины явились достижения молекулярной биологии и генетики в изучении тонкой структуры генов эукариот, их картировании на хромосомах млекопитающих, и прежде всего человека, впечатляющие успехи проекта «Геном человека» в идентификации и клонировании генов, мутации которых приводят к многочисленным наследственным болезням, и, наконец, бурный рост в области биотехнологии и генной инженерии. Последние 10 лет интенсивного развития генетики и особенно генетики человека обеспечили новый этап в развитии медицины и её переход на молекулярный уровень. Геномика человека является основой молекулярной медицины. Резкое увеличение геномной информации стало стартовой точкой для переосмысления процессов развития человека и его болезней. Развитие пато-логических процессов прослеживается на молекулярном уровне от первичного продукта гена до исхода заболевания. Появилась возможность введения новых генов в различные организмы, что для врача имеет глубокий смысл, потому что коренным образом изменяется наша способность понимать, диагностировать и лечить болезни. Принимая во внимание все преимущества новых терапевтических воздействий, современный врач должен детально понимать функции, развитие и рост клеток на молекулярном уровне. Цель этой книги заключается в том, чтобы представить эту информацию четко, просто и кратко, что даст студентам возможность понять клеточную и молекулярную основу процессов заболевания. Данное учебно-методическое пособие подготовлено в соответствии с учебной программой для студентов высших медицинских учебных заведений III-IV уровней аккредитации (протокол № 2 от 27.05.2005 г.). Весь материал подразделяется на три части: «Молекулярные основы наследственности», «Молекулярные основы наследственных заболеваний», «Современные вопросы генных технологий». В первой части пособия освещены этапы развития молекулярной биологии и генетики; структура и функции белков, ДНК, РНК; механизмы и регуляция экспрессии генов про- и эукариот; организация геномов неклоточных и клоточных организмов. Во второй – раскрыты молекулярные механизмы генных, хромосомных и геномных мутаций у человека. Описаны моногенные наследственные заболевания, мутагенные факторы, генеративные и соматические мутации, апоптоз и генетические механизмы канцерогенеза. В третьей – изложены современные методы исследования нуклеиновых кислот (полимеразная цепная реакция и др.), методы ДНК-диагностики, молекулярно-генетические методы исследований в судебной медицине, принципы конструирования рекомбинантных ДНК и трансгенных организмов, рекомбинантные лекарственные препараты, генные вакцины, генная терапия и терапевтическое клонирование.



## 2. Конструирование рекомбинантных ДНК

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова "фрагмент ДНК" и "объединение *in vitro*", что указывает на сущность генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т.д.

Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК.

Сшивка по одноименным "липким" концам (рестриктазно лигазный метод)

Этот метод является самым распространенным и популярным. Впервые этим способом гибридная ДНК была получена С. Коэном с сотрудниками в 1973 году. Некоторые рестриктазы, например Pst I, внося в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания и образующие "ступеньку" (рис. 36). Эти комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований, и поэтому их называют комплементарными или липкими концами. Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образуемые Eco RI, не будут спариваться, например, с АГЦТ-концами, образуемыми Hind III. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут слипаться за счет образования водородных связей между одонитевыми участками комплементарных нуклеотидов.

## 3. Выделение генов

Выделить требуемый ген и заставить его работать в новых для него генетических условиях проще всего в случае бактериальных и вирусных генов, поскольку геном этих микроорганизмов невелик. Кроме того, бактериальные гены, как правило, не содержат интронов и даже гетерологичные бактериальные гены хорошо экспрессируются в клетках *E. coli*. При клонировании эукариотического гена необходимо решить, нужна ли экспрессия рекомбинантного гена в клетках микроорганизмов или же можно ограничиться исследованием его структуры? Очевидно, что в первом случае нужно думать о создании клонотеки безинтронных кДНК, а во втором - клонотеки геномной ДНК исследуемого объекта, что технически менее сложно. Если отсутствуют сведения о первичной структуре клонируемого гена, то источником получения информации о последовательности его нуклеотидов может быть кодируемый этим геном белок.

Определив последовательность нескольких N-концевых аминокислот белка, можно в соответствии с генетическим кодом синтезировать ряд олигонуклеотидных зондов, которые далее используют для скрининга клонотеки генов. В этом случае удобнее использовать экспрессирующую клонотеку кДНК, так как для получения необходимой информации нужно будет исследовать меньшее количество клонов. Действительно, в клонотеках кДНК отсутствует большинство некодирующих последовательностей нуклеотидов, суммарная длина которых может значительно (на два-три порядка) превышать таковую значимых последовательностей. Однако при использовании таких клонотек встает вопрос об их репрезентативности, поскольку внутриклеточное содержание индивидуальных мРНК сильно различается в клетках разных тканей. После выделения рекомбинантной ДНК, гибридизующейся с олигонуклеотидными зондами,

можно идентифицировать кодируемый кДНК белок после ее экспрессии с использованием специфических антител. Или кодирующий потенциал клонированной кДНК определяют после ее гибридизации с суммарной мРНК, выделяя фракцию мРНК, задерживаемой иммобилизованной кДНК на носителе, с последующей трансляцией мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе. Кроме того, если клонированная кДНК кодирует мРНК исследуемого белка, то они и в растворе образуют специфический ДНК-РНК-гибрид, и мРНК перестает участвовать в трансляции в бесклеточной системе (метод прерванной трансляции). Наличие или отсутствие белкового продукта бесклеточной трансляции легко обнаружить с помощью специфических антител.

#### 4. Экспрессия генов

Экспрессия генов - это процесс, в котором наследственная информация от гена (последовательности нуклеотидов ДНК) преобразуется в функциональный продукт - РНК или белок. Экспрессия генов может регулироваться на всех стадиях процесса: и во время транскрипции, и во время трансляции, и на стадии пост-трансляционных модификаций белков.

Регуляция генов дает клеткам контроль над структурой и функцией и является основой дифференцировки клеток, морфогенеза и адаптации. Регуляция генов также является субстратом для эволюционных изменений, так как контроль за временем, местом и количественным фактором экспрессии гена может иметь эффект на функции генов в целом организме.

Существуют гены, кодирующие нематричную РНК (например, рРНК, тРНК), которые транскрибируются, но не транслируются в белки.

Процесс экспрессии генов происходит в организмах всех живых существ: эукариот (в том числе в многоклеточных организмах), прокариот (у бактерий и архей), а также вирусов - для создания макромолекулярных основ для их жизнедеятельности. Некоторые процессы, происходящие при экспрессии генов, могут модулироваться определенными факторами, например транскрипция, сплайсинг РНК, трансляция и посттрансляционная модификация белка.

#### 1.4 Лекция № 4 (2 часа)

Тема: Биотехнология в животноводстве

##### 1.4.1 Вопросы лекции:

1. Трансплантация эмбрионов
2. Оплодотворение яйцеклеток вне организма животного

##### 1.4.2 Краткое содержание вопросов

###### 1. Трансплантация эмбрионов

Разработка метода искусственного осеменения сельскохозяйственных животных и его практическое применение обеспечили большой успех в области улучшения генетики животных. Использование этого метода в сочетании с длительным хранением семени в замороженном состоянии открыло возможность получения десятков тысяч потомков от одного производителя в год. Этот прием, по существу, решает проблему рационального использования производителей в практике животноводства.

Что касается самок, то традиционные методы разведения животных позволяют получать от них лишь несколько потомков за всю жизнь. Низкий уровень воспроизводства у самок и длительный интервал времени между поколениями (6-7 лет у крупного рогатого скота) ограничивают генетический процесс в животноводстве. Решение этой проблемы ученые видят в применении метода трансплантации эмбрионов. Суть метода состоит в том, что генетически выдающиеся самки освобождаются от необходимости вынашивания плода и вскармливания потомства. Кроме того, их стимулируют с целью увеличения выхода яйцеклеток, которые затем извлекают на стадии ранних зародышей и пересаживают менее ценным в генетическом отношении реципиентам.

Технология трансплантации эмбрионов включает такие основные звенья, как вызывание суперовуляции, искусственное осеменение донора, извлечение эмбрионов (хирургическое или нехирургическое), оценка их качества, кратковременное или длительное хранение и пересадка.

Стимуляция суперовуляции. Самки млекопитающих рождаются с большим (несколько десятков и даже сотен тысяч) числом половых клеток. Большинство из них постепенно погибают в результате атрезии фолликулов. Только небольшое число примордиальных фолликулов переходят в антральные в процессе роста. Однако практически все растущие фолликулы реагируют на гонадотропную стимуляцию, которая приводит их к конечному созреванию. Обработка самок гонадотропинами в фолликулярной фазе полового цикла или в лютеиновой фазе цикла в сочетании с индуцированием регрессии желтого тела простагландином Ф2 (ПГФ2) или его аналогами приводит к множественной овуляции или так называемой суперовуляции.

Крупный рогатый скот. Индукцию суперовуляции у самок крупного рогатого скота проводят обработкой гонадотропинами, фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ) или сывороткой крови жеребой кобылы (СЖК), начиная с 9-14-го дня полового цикла. Через 2-3 дня после начала обработки животным вводят простагландин Ф2а или его аналоги, чтобы вызвать регрессию желтого тела.

В связи с тем, что сроки овуляции у гормонально обработанных животных увеличиваются, изменяется и технология их осеменения. Первоначально рекомендовалось многократное осеменение коров с использованием нескольких доз спермы. Обычно вводят 50 млн. живых сперматозоидов в начале охоты и через 12-20 ч осеменение повторяют.

Извлечение эмбрионов. Эмбрионы крупного рогатого скота поступают из яйцевода в матку между 4-м и 5-м днем после начала охоты (между 3-м и 4-м днем после овуляции),

В связи с тем, что нехирургическое извлечение возможно только из рогов матки, то эмбрионы извлекают не ранее 5-го дня после начала охоты.

Несмотря на то, что при хирургическом извлечении эмбрионов у крупного рогатого скота достигнуты отличные результаты, этот метод неэффективен - относительно дорогостоящий, неудобный для применения в условиях производства.

Нехирургическое извлечение эмбрионов состоит в использовании катетора.

Наиболее оптимальные сроки для извлечения эмбрионов - 6-8-й день после начала охоты, так как ранние бластоцисты этого возраста наиболее пригодны для глубокого замораживания и могут быть с высокой эффективностью пересажены нехирургическим способом. Корову-донора используют 6-8 раз в год, извлекая по 3-6 эмбрионов.

У овец и свиней нехирургическое извлечение эмбрионов невозможно ввиду трудности прохождения катетера через шейку в рога матки. Однако хирургическая операция у этих видов животных относительно проста и непродолжительна.

Пересадка эмбрионов. Параллельно с разработкой хирургического метода извлечения эмбрионов у крупного рогатого скота значительный прогресс был достигнут и в нехирургической пересадке эмбрионов. В пайету набирают свежую питательную среду (столбик длиной 1,0-1,3 см), затем небольшой пузырек воздуха (0,5 см) и далее основной объем среды с эмбрионом (2-3 см). После этого засасывают немного воздуха (0,5 см) и питательную среду (1,0-1,5 см). Пайету с эмбрионом помещают в катетер Кассу и до момента пересадки хранят в термостате при 37°C. Нажатием на шток катетера выдавливают содержимое пайеты вместе с эмбрионом в рог матки.

## 2. Оплодотворение яйцеклеток вне организма животного

Разработка системы оплодотворения и обеспечения ранних стадий развития эмбрионов млекопитающих вне организма животного (*in vitro*) имеет огромное значение в решении ряда научных задач и практических вопросов, направленных на повышение эффективности разведения животных.

Для этих целей необходимы эмбрионы на ранних стадиях развития, которые можно извлечь только хирургическими методами из яйцеводов, что является трудоемким и не дает достаточного числа зародышей для проведения этой работы.

Оплодотворение яйцеклеток млекопитающих *in vitro* включает следующие основные этапы: созревание ооцитов, капацитацию сперматозоидов, оплодотворение и обеспечение ранних стадий развития.

Созревание ооцитов *in vitro*. Большое число половых клеток в яичниках млекопитающих, в частности у крупного рогатого скота, овец и свиней с высоким генетическим потенциалом, представляет источник огромного потенциала воспроизводительной способности этих животных в ускорении генетического прогресса по сравнению с использованием возможностей нормальной овуляции. У этих видов животных, как и других млекопитающих, число ооцитов, овулирующих спонтанно во время охоты, составляет только незначительную часть от тысяч ооцитов, находящихся в яичнике при рождении животного. Остальные ооциты регенерируют внутри яичника или, как говорят обычно, подвергаются атрезии. Естественно возникал вопрос, нельзя ли выделить ооциты из яичников путем соответствующей обработки и провести их дальнейшее оплодотворение вне организма животного. В настоящее время не разработаны методы использования всего запаса ооцитов в яичниках животных, но значительное число ооцитов может быть получено из полостных фолликулов для дальнейшего их созревания и оплодотворения вне организма.

В настоящее время применение на практике нашло созревание *in vitro* только ооцитов крупного рогатого скота. Ооциты получают из яичников коров после убоя животных и путем прижизненного извлечения, 1-2 раза в неделю. В первом случае яичники берут от животных после убоя, доставляют в лабораторию в термостатированном контейнере в течение 1,5-2,0 ч. В лаборатории яичники дважды промывают свежим фосфатным буфером. Ооциты извлекают из фолликулов, диаметр которых 2-6 мм, путем отсасывания или разрезания яичника на пластинки. Ооциты собирают в среду TCM 199 с добавлением 10 % сыворотки крови от коровы в охоте, затем дважды промывают и отбирают для дальнейшего созревания *in vitro* только ооциты с компактным кумулюсом и однородной цитоплазмой.

В последнее время разработан способ прижизненного извлечения ооцитов из яичников коров с помощью ультразвукового прибора или лапароскопа. При этом ооциты отсасывают из фолликулов, диаметр которых не менее 2 мм, 1-2 раза в неделю от одного и того же животного. В среднем получают однократно 5-6 ооцитов на животное. Менее 50 % ооцитов пригодны для созревания *in vitro*.

## Лекция № 5 (2 часа)

Тема: Биотехнология в животноводстве

### 1. Вопросы лекции:

1. Клеточная инженерия в животноводстве
2. Генная инженерия в животноводстве

### 3. Краткое содержание вопросов

#### 1. Клеточная инженерия в животноводстве

Клеточная инженерия – это создание клеток нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. Клеточная инженерия включает реконструкцию жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, объединение целых клеток, принадлежавших различным видам, с образованием клетки, несущей генетический материал обеих клеток, и другие операции. Клеточная инженерия используется для решения теоретических проблем в биотехнологии и является одним из основных её методов для создания новых форм растений и животных.

Наряду с развитием методов генной инженерии в животноводстве перспективны способы клеточной инженерии. В растениеводстве в селекции эти методы уже получили значительное развитие. Культивирование клеток растений *in vitro* обеспечивает возможность применять системы интенсивного отбора клеток, культивированных в строго контролируемых селективных условиях.

Присущие растительным клеткам свойства тотипотентности (свойство отдельных клеток развиваться в целостный организм) дают возможность плюс-варианты регенерировать в целые растения и использовать в процессе селекционной работы.

Методы клеточной инженерии перспективны и в животноводстве. Уже накоплен большой опыт культивирования соматических клеток животных *in vitro*, разработаны оптимальные среды и режимы культивирования, отработаны способы длительного хранения клеток при низких температурах. Как уже было сказано, активные исследования проводятся и по культивированию генеративных клеток. Разработка этих методов создает прочную основу для развертывания теоретических и прикладных работ по клеточной инженерии сельскохозяйственных животных, которые будут иметь все возрастающее народнохозяйственное значение.

На первое место следует поставить уже достаточно хорошо разработанный метод деления ранних эмбрионов. С развитием трансплантации в руках исследователей появилось достаточное количество ранних эмбрионов, что дало мощный импульс работам по манипуляции с этими объектами. Первый успешный опыт по разделению эмбрионов на стадии 2-8 бластомеров был осуществлен Виллардом (Кембридж, Великобритания). Однако получение такого материала связано с большими трудностями и может быть осуществлено в научно-исследовательских учреждениях.

В результате исследователи начали манипулировать с эмбрионами в более поздних стадиях развития (морула, бласто-циста). Сущность метода заключается в том, что предварительно вскрывается прозрачная зона (*pellucida*), эмбрион разделяется на две части. При этом одна половина остается в прежней зоне, а другую переносят в заранее подготовленную зону и производят обычную трансплантацию. Во многих опытах приживаемость разделенных эмбрионов достигает 50—60%. Прикладной аспект этой методики заключается в увеличении числа телят, полученных от каждого донора. По данным американских исследователей, половинки эмбрионов, инкубировавшиеся без прозрачной оболочки, сохраняли жизнеспособность в культуре только в 15% случаев, а при наличии зоны пеллюцида — в 35% случаев. Наилучшие результаты были получены при

нехирургическом введении половинок эмбрионов - каждая в отдельной прозрачной оболочке в разные рога матки одного и того же реципиента (55% стельности).

В другом опыте были достигнуты еще лучшие результаты при хирургическом введении каждой половинки эмбриона в рог матки на той стороне, где локализовалось желтое тело (65% стельности). Стало очевидным, что разделение эмбрионов - эффективный метод увеличения потомства коров-доноров.

В настоящее время эта методика начинает внедряться в практику племенного дела. Уже получены животные от трансплантации половинок эмбрионов свиней (США, Р. У. Роунтри). По данным ряда исследователей, число потомков может быть увеличено на 30-35%. Однако этим не ограничивается значение клеточно-инженерной операции. Возможность массового получения идентичных двоен (генетических копий) очень важна. Эти животные имеют большую ценность для исследователей, занимающихся проблемой взаимодействия генотипа и среды. Использование идентичных двоен позволяет повысить точность исследований и достичь достоверных результатов при меньшем числе подопытных животных. Кроме того, наличие идентичных близнецов позволяет на одном из них проводить изучение признаков, требующих убоя животного (например, мясные качества), и переносить эти данные на близнеца, что является методически вполне обоснованным. Все это позволяет более точно и всесторонне оценить данный генотип. Кроме того, при трудоемкой и длительной работе по оценке быков по качеству потомства эту работу можно проводить только с одним из двойневых идентичных быков. Оценка одного животного будет соответствовать оценке и другого идентичного животного. Имеется информация о том, что уже получено потомство при разделении бластоцисты на 4 части. Это еще в значительной мере увеличивает значение данного метода клеточной инженерии для повышения эффективности селекционно-племенной работы и исследований в области генетики сельскохозяйственных животных.

## 2. Генная инженерия в животноводстве

Японские ученые создали генномодифицированную мышь которая чирикает как птица

Японские ученые вывели мышь, которая чирикает как птица, это генномодифицированное животное созданное в рамках проекта Evolved Mouse Project (Проект эволюционирования мыши).

Группа исследователей из университета Осака сегодня 21 декабря представили новое животное из серии разведения генетически модифицированных животных, которые склонны к микрокопированию частей ДНК и более склонны к мутациям.

«Чирикающая» мышь была ими выведена в рамках проекта эволюции мышей. Мутации являются движущей силой эволюции. Мы осуществляем кросс-разведение генетически модифицированных мышей, чтобы наблюдать что может произойти в результате этого процесса, – заявил руководитель группы Арикуни Учимура (Arikuni Uchimura).

Мы тестировали один за другим рождавшихся в этом процессе мышат и вдруг получили мышь, которая зачирикала. Она произведена случайно, но теперь они пытаются закрепить этот тип животного в его наследстве.

Удивление вызвал этот результат и потому, что ученые скорее ожидали видоизменений в форме и размерах. Так они уже получали мышей с короткими хвостами и лапами, типа таксы. Сейчас они уже получили около 100 поющих мышей и продолжают с ними экспериментировать. Группа надеется в ходе этого эксперимента открыть ход эволюции голосов животных в человеческую речь, чтобы понять происхождение речи.

Мыши более подходят для цели исследования, чем птицы, потому что они млекопитающие и имеют более схожую генную структуру головного мозга с человеком и другие биологические аспекты. Сейчас они наблюдают как мышь, которая чирикает

влияет ли на сообщество мышей, есть ли это коммуникация, так как обычно мыши питаются только в стрессовых ситуациях. Первые результаты показывают, что коммуникации видоизменяются в смешанной группе из обычных мышей и «чирикающих».

Генномодифицированные мыши доказали существование нового "гена ожирения"

Исследование, проведенное в Оксфордском университете, подтвердило, что риск развития ожирения в значительной мере определяется геном под названием FTO. По данным исследователей, генномодифицированные мыши, являвшиеся носителями дополнительных копий этого гена, весили на 10-20 процентов больше своих обычных собратьев.

Первые свидетельства связи гена FTO с риском развития ожирения были получены в 2008 году в результате масштабного международного генетического исследования. Тогда было установлено, что наличие определенных вариантов этого гена связано с 70-процентным риском развития ожирения. Впрочем, полученные в ходе исследования данные не позволяли однозначно утверждать наличие причинно-следственной связи между развитием ожирения и генетическими особенностями участников исследования.

Чтобы восполнить этот пробел, оксфордские ученые вывели генетически модифицированных мышей – носителей двух дополнительных копий неблагоприятного варианта гена FTO. По мере взросления такие мыши ели значительно больше и набирали вес быстрее своих сородичей. Модифицированные самцы весили в среднем на 10 процентов, самки – на 20 процентов больше по сравнению с обычными мышами того же возраста.



## 1.6 Лекция № 6 (2 часа)

Тема: Биотехнология кормовых препаратов для сельскохозяйственных животных

### 1.6.1 Вопросы лекции:

1. Получение кормовых белков
2. Производство незаменимых аминокислот

### 1.6.2 Краткое содержание вопросов

#### 1. Получение кормовых белков

Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма, выполняющими жизненно важные функции: каталитические, регуляторные, транспортные, биоэнергетические, защитные от инфекций и других стрессовых факторов, структурные, запасные и др. В вегетативной массе растений на долю белков приходится 5-15% сухого вещества, в зерне злаков 8-18%, семенах масличных растений-16-28%, зерне зернобобовых 20-40% .В различных тканях организма человека и животных содержание белка обычно от 20-80% сухой массы.

Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ - углекислоты, воды и минеральных солей, тогда как в организме человека и животных некоторые аминокислоты не могут синтезироваться, и должны поступать в организм в готовом виде как компоненты пищи. Такие аминокислоты принято называть незаменимыми, к ним относятся валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин. Отсутствие в пище хотя бы одной незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека, а недостаток их в кормах снижает продуктивность с.х. животных.

Главным источником незаменимых аминокислот для человека являются белки животного или растительного происхождения, входящие в состав пищи, а для с.х. животных - главным образом растительные белки. Поступающие с пищей или кормом белковые вещества под действием ферментов желудочного сока гидролизуются до аминокислот, которые затем используются для образования белковых молекул человеческого или животного организма.

Все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках пищи в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма. Если хотя бы одна аминокислота оказывается в недостатке, то другие аминокислоты, оказавшиеся в избытке, не будут использоваться для синтеза белков. В таких условиях для обеспечения дальнейшего синтеза белковых веществ и поддержания жизнедеятельности организма потребуется дополнительное количество кормового белка, вследствие чего увеличится расходование пищи или корма. Последнее очень важно учитывать в животноводстве, т.к. несбалансированность кормовых белков по содержанию незаменимых аминокислот приводит к значительному перерасходу кормов и существенному и повышению себестоимости животноводческой продукции. Для предотвращения перерасхода кормов необходимо контролировать, с одной стороны, сбалансированность белков корма по содержанию незаменимых аминокислот, а с другой стороны, количество белка в корме.

В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей от 60 до 120г полноценного белка. Для правильного кормления с.х. животных необходимо, что бы в их кормовом рационе в расчете на каждую кормовую единицу содержалось 100-120г хорошо перевариваемого и полноценного белка.

Если содержание белков в растительной массе, используемой для кормления с.х. животных ниже, чем требуется по нормам, то во избежании перерасхода кормов и повышения себестоимости животноводческой продукции количества белка в корме

балансируют путем добавления белковых концентратов. По такому же принципу контролируют содержание в кормовом белке незаменимых аминокислот.

Дешевым источником кормового и пищевого белка является соя, белки которой хорошо сбалансированы по аминокислотному составу и их содержание в семенах достигает 35-40%. Однако большой удельный вес в структуре кормопроизводства нашей страны составляют зерновые культуры. Для балансирования кормов, включающих в качестве основного компонента зерно злаковых культур, по белку и незаменимым аминокислотам применяются концентрированные кормовые добавки - комбикорма.

Для приготовления комбикормов обычно используют мясо- костную или рыбную муку, отходы мясной и молочной промышленности, жмыхи масличных растений, отруби. Учитывая, что рыбная и костная мука, другие белковые отходы животного происхождения во всё большем объеме направляются на получение пищевых белков, требуется их полноценный заменитель, способный сбалансировать недостаток белков и незаменимых аминокислот не только в зерновой части кормового рациона, но и в растительных компонентах комбикормов

Установлено, что высокой интенсивностью синтеза белков отличаются многие микроорганизмы, причем белки микробных клеток имеют повышенное содержание незаменимых аминокислот. Содержание белков в микроорганизмах достигает 60% сухой массы. Наряду с белками в микробных клетках образуются и другие ценные в питательном отношении вещества: легкоусвояемые углеводы, липиды с повышенным содержанием ненасыщенных жирных кислот, витамины, макро - и микроэлементы.

При использовании микроорганизмов на ограниченной площади можно организовать промышленное производство и получать большое количество кормовых концентратов в любое время года, причем микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельского хозяйства и промышленности и, таким образом, позволяют одновременно решать другую важную проблему – утилизацию этих отходов в целях охраны окружающей среды.

Микроорганизмы имеют еще одно ценное преимущество – способность очень быстро наращивать белковую массу. Например, растения сои массой 500 кг в фазе созревания семян способны в сутки синтезировать 40 кг белков, бык какой же массы – 0,5-1,5кг, а дрожжевые клетки массой 500 кг до 1,5т белков. В качестве источников кормового белка наиболее часто используют различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли, белковые коагуляты травянистых растений.

### ***Кормовые дрожжи***

В качестве исходного сырья при получении кормового белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, льняная костра, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, виноградные выжимки, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности.

В России и некоторых нефтедобывающих странах разработаны технологии получения кормовых дрожжей из n-парафинов нефти. В нашей стране первый завод по производству кормовых дрожжей из жидких парафинов нефти вступил в действие в 1971 г.

Хороший субстрат для выращивания кормовых дрожжей – молочная сыворотка, являющаяся производственным отходом при переработке молока.

Наряду с использованием дрожжевых белков в качестве кормовой добавки при балансировании рационов с.х. животных ставится задача сделать эти белки пригодными для питания человека.

При переработки в пищевой белок биомассу дрожжей очищают. Очищенные диализом белки используют в качестве добавок в различные пищевые продукты: сосиски, студни, мясные и кондитерские начинки.

Белки дрожжей находят так же применение при получении искусственного мяса.

### ***Белковые концентраты из бактерий***

Важное значение для кормопроизводства имеют также бактериальные белковые концентраты с содержанием сырого белка 60-80% от сырой массы. Бактерии способны наращивать биомассу в несколько раз быстрее дрожжевых клеток и в белке бактерий содержится значительно больше серосодержащих аминокислот, в следствии чего он имеет более высокую биологическую ценность, по сравнению с белком дрожжей. Источником углерода для бактерий могут служить различные газообразные продукты (природный и попутный газ, конденсат и др.), низшие спирты (Метанол и этанол), водород.

Обычно кормовой белок бактериального происхождения добавляют в комбикорма в количестве 2,5-7,5% от белка рациона, при кормлении взрослых свиней- до 15%. Основное препятствие, которое не позволяет его использовать в большей концентрации – повышенное содержание нуклеиновых кислот (10-25%).

## **2. Производство незаменимых аминокислот**

Получение кормовых белковых концентратов с повышенным содержанием незаменимых аминокислот позволяет балансировать корма сельскохозяйственных животных главным образом по уровню белка, тогда как оптимальный аминокислотный состав кормового белка при таком способе балансирования полностью не достигается.

По некоторым аминокислотам почти всегда требуется, для доведения их концентрации в кормовом рационе до оптимума, добавление препаратов чистых аминокислот, полученных промышленным способом. В мире ежегодно производится не менее 300 тыс. т кормовых препаратов незаменимых аминокислот.

Возможно три способа промышленного получения незаменимых аминокислот:

1. Гидролиз белков растительного и микробного происхождения;
2. Микробиологический синтез;
3. Химический синтез.

Более 60% всех производимых промышленностью чистых препаратов аминокислот получают путём микробиологического синтеза. На втором месте по объёму производства находится химический синтез. Основным недостатком химического синтеза является получение смеси аминокислот, состоящей из изомеров, относящихся как к D-, так и к L-ряду, тогда как биологической активностью в организме человека и животных обладают лишь L-формы. D-формы аминокислот не перевариваются ферментными системами этих организмов, а некоторые из них токсичны для человека и животных. Исключением в этом отношении является аминокислота метионин, у которой биологически активны как D-, так и L-формы, в связи с чем данная аминокислота производится преимущественно методом химического синтеза.

Технологически получение аминокислот за счёт гидролиза белков экономически менее выгодно, поэтому не получило широкого распространения.

Путём микробиологического синтеза образуются L-аминокислоты, являющиеся продуктами жизнедеятельности специально подобранных и отселекционированных штаммов микроорганизмов, которые способны накапливать в культуральной жидкости до 150 г /л синтезируемой аминокислоты.

На основе культивирования микроорганизмов с целью получения чистых препаратов аминокислот применяются промышленные технологии, включающие одно- и двухступенчатый синтез аминокислот. При одноступенчатом синтезе:

1. В промышленных культиваторах выращивают ауксотрофные мутанты, являющиеся сверхпродуцентами тех или иных аминокислот;
2. После завершения рабочего цикла их выращивания производится отделение культуральной жидкости от клеток микроорганизмов;
3. Сгущение культуральной жидкости;

4.Получение из культуральной жидкости товарного продукта с высокой концентрацией синтезированной микробами аминокислоты.

В процессе двухступенчатого синтеза аминокислоты:

1. Вначале получают её предшественника более дешёвым химическим синтезом;
2. Затем с помощью ферментов, вырабатываемых микроорганизмами, производится превращения предшественника в аминокислоту, при этом образуется только L-форма.

## 1.7 Лекция № 7 (2 часа)

Тема: Биотехнология кормовых препаратов для сельскохозяйственных животных

### 1.7.1 Вопросы лекции:

1. Производство витаминных кормовых препаратов
2. Кормовые липиды
3. Ферментные препараты

### 1.7.2 Краткое содержание вопросов

#### 1. Производство витаминных кормовых препаратов

Биологическая активность витаминов определяется тем, что они в качестве активных группировок входят в состав каталитических центров ферментов. Поэтому при недостатке этих веществ понижается активность соответствующих ферментов и, как следствие, ослабляются или полностью прекращаются биохимические процессы, происходящие с участием данных ферментов. Это является причиной ряда серьезных заболеваний, вызванных недостатком витаминов.

Организмы человека и животных не способны к синтезу витаминов, тогда как растения при нормальных условиях развития полностью обеспечивают себя необходимыми витаминами (за исключением витамина В12). Микроорганизмы также синтезируют большинство необходимых им витаминов. Исходя из этого видно, что продукты растительного и микробного происхождения представляют собой незаменимые источники витаминов, как для животных, так и для человека.

Удовлетворение потребности этих организмов осуществляется двумя путями – поступление с пищей и синтез микрофлорой желудочно-кишечного тракта. Для организмов с однокамерным желудком, имеющим значительно меньше микрофлоры, главный путь обеспечения витаминами – потребление их с пищей. Другой путь – потребление их метаболитических предшественников – провитаминов, которые в организме человека и животных превращаются в витамины. В то же время жвачные животные, имеющие в преджелудках обильную микрофлору, способную к синтезу витаминов, в значительной степени удовлетворяют свою потребность многих витаминах за счёт переваривания клеток отмерших микроорганизмов.

Поскольку корма растительного происхождения имеют не оптимальный состав и постоянно меняющееся содержание необходимых животным витаминов, при составлении кормовых рационов возникает необходимость добавлять в корма препараты, обогащённые витаминами, которые получают из культур микроорганизмов. Микробиологическая промышленность многих стран, в том числе России, выпускает два вида кормовых витаминных препаратов – кормовой рибофлавин, содержащий витамин В2, и КМВ12, имеющем в своём составе витамин В12.

Кормовые препараты витамина В2 (рибофлавин). Витамин В2 входит в состав активных групп окислительно-восстановительных ферментов – флавиномононуклеотида (ФМН). Поэтому при его недостатке наблюдается ослабление окислительно-восстановительных процессов в организме. По нормам кормления этого витамина свиньям требуется не менее 2-7 мг, лошадям и птице - 2-5 мг на 1 кг сухого корма. Однако в растительной продукции, используемой в кормопроизводстве, витамина В12 содержится недостаточно. Много рибофлавина могут синтезировать микроорганизмы – различные виды бактерий, актиномицеты, дрожжевые клетки. Некоторые из них способны накапливать в культуральной среде до 1 мг/мл витамина В2.

В качестве промышленных продуцентов кормового рибофлавина используются отселекционированные штаммы дрожжей *Eremothecium ashbyii*. Рибофлавин

накапливается в вакуолях дрожжевых клеток и придаёт культуре характерную жёлтую окраску. Для производственной ферментации готовятся отдельно жидкая питательная среда и посевной материал культуры дрожжей, выращенный в специальном посевном аппарате.

## 2. Кормовые липиды

Под липидами подразумеваются все растворимые в неполярных растворителях клеточные компоненты микроорганизмов. В настоящее время ведутся поиски новых источников получения жиров, в том числе и на технические нужды. Этим источником могут стать микроорганизмы, липиды которых после соответствующей обработки пригодны для использования в различных отраслях промышленности: медицинской, химико-фармакоцевтической, лакокрасочной, шинной и других, что позволит высвободить значительные количества масел животного и растительного происхождения.

Технологический процесс получения микробных липидов, в отличие от получения белковых веществ, обязательно включает стадию выделения липидов из клеточной массы методом экстракции в неполярном растворителе (бензине или эфире). При этом получают одновременно два готовых продукта: микробный жир (био жир) и обезжиренный белковый препарат (биошрот).

Сырьем для этого процесса являются те же среды, что и для производства кормовой биомассы. В процессе культивирования микроорганизмов на различных средах получают три класса липидов: простые, сложные липиды и их производные.

Простые липиды - нейтральные жиры и воски. Нейтральные жиры (основные запасные компоненты клетки) - эфиры глицерина и жирных кислот, основная масса которых триацилглицериды (есть, впрочем ещё и моно- и диглицериды). Воски - эфиры жирных кислот или монооксикислот и алифатических спиртов с длинной углеродной цепью. По структуре и свойствам близки к нейтральным липидам. Наибольшее количество нейтральных липидов синтезируют дрожжи и мицелиальные грибы. Простые липиды находят применение как технологические смазки в процессах холодной и тепловой обработки металлов. Продуцентами сложных липидов являются в основном бактерии.

Сложные липиды делятся на две группы: фосфолипиды и гликолипиды. Фосфолипиды (фосфоглицериды и сфинголипиды) входят в состав различных клеточных мембран и принимают участие в переносе электронов. Их молекулы полярны и при pH 7,0 фосфатная группа несет отрицательный заряд. Концентрат фосфолипидов находит применение в качестве антикоррозийной присадки к маслам и как добавка при флотации различных минералов. Гликолипиды в отличие от фосфолипидов не содержат молекулы фосфорной кислоты, но также являются сильнополярными соединениями за счет наличия в молекуле гидрофильных углеводных групп (остатков глюкозы, маннозы, галактозы и др.).

К производным липидов относят жирные кислоты, спирты, углеводороды, витамины Д, Е и К. Жирные кислоты представлены насыщенными и ненасыщенными с одной двойной связью кислотами нормального строения и четным числом углеродных атомов (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая). Среди диеновых жирных кислот можно выделить линолевую. Двойные связи в ненасыщенных жирных кислотах микробных липидов часто располагаются так, что делят их на части, число углеродных атомов в которых кратно трем. Очищенные монокарбоновые кислоты с числом углеродных атомов 14-18 находят широкое применение в мыловаренной, шинной, химической, лакокрасочной и других отраслях промышленности.

Спирты, присутствующие в липидах, делятся на три группы: спирты с прямой цепью, спирты с  $\beta$ -ионовым кольцом, включающие витамин А и каротиноиды, а также стеринны - компоненты неомыляемой части липидов (например, эргостерин, облучение которого ультрафиолетовым светом позволяет получать витамин Д<sub>2</sub>).

## Микроорганизмы - продуценты липидов

Для промышленного использования важное значение имеет способность усиленно накапливать липиды. Этой способностью обладают немногие микроорганизмы, в первую очередь дрожжи. Процесс образования липидов у большинства дрожжей состоит из двух четко разграниченных стадий:

- первая характеризуется быстрым образованием белка в условиях усиленного снабжения культуры азотом и сопровождается медленным накоплением липидов (в основном глицерофосфатов и нейтральных жиров);
- вторая - прекращением роста дрожжей и усиленным накоплением липидов (в основном нейтральных).

### 3. Ферментные препараты

Классификация ферментов основана на механизме их действия и включает 6 классов.

Ферменты как биокатализаторы обладают рядом уникальных свойств, например, таких как высокая каталитическая активность и избирательность действия. В ряде случаев ферменты обладают абсолютной специфичностью, катализируя превращение только одного вещества. Для каждого фермента существует свой оптимум pH, при котором его каталитическое действие максимально. При резком изменении pH ферменты инактивируются из-за необратимой денатурации. Ускорение реакции при повышении температуры также лимитировано определенными пределами, поскольку уже при температуре 40-50°C многие ферменты денатурируют. Эти свойства ферментов приходится учитывать при разработке технологии нового препарата.

Поскольку ферменты - вещества белковой природы, в смеси с другими белками их количество определить практически невозможно. Наличие фермента в препарате может быть установлено лишь по протеканию той реакции, которую катализирует фермент. При этом количественную оценку содержания фермента можно дать, определив либо количество образовавшихся продуктов реакции, либо количество израсходовавшегося субстрата. За единицу активности фермента принимают то его количество, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в 1 минуту при заданных стандартных условиях - стандартная единица активности.

По решению Международного биохимического союза активность решено определять при  $t = 30^{\circ}\text{C}$  по начальной скорости реакции, когда концентрация насыщения фермента и временная зависимость близка к кинетике реакции нулевого порядка. Остальные параметры реакции индивидуальны для каждого фермента. Активность ферментного препарата выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего под действием 1 мл ферментного раствора или 1 грамма препарата в оптимальных условиях за 1 минуту. Если ферментный препарат не содержит балласта, то его активность выражается в тех же стандартных единицах на 1 мг фермента. Если же есть балласт, то активность считается на 1 мг белка в ферментном препарате. Активность выпускаемого препарата - важнейший нормируемый показатель качества.

Основную часть ферментов, получаемых промышленным способом, составляют гидролазы. К ним относятся, в первую очередь амилазные ферменты:  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза, глюкоамилаза. Их основная функция - гидролиз крахмала и гликогена. Крахмал при гидролизе расщепляется на декстрины, а затем до глюкозы. Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

Протеолитические ферменты образуют класс пептидгидролаз. Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках и пептидах. Важная их особенность - селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин

- на связь между аргинином и лизином. В промышленности протеолитические ферменты классифицируют по способности проявлять активность в определенной области pH:

pH 1.5 - 3.7 - кислые протеазы;

pH 6.5 - 7.5 - протеазы;

pH > 8.0 - щелочные протеазы.

Протеазы находят широчайшее применение в разных отраслях промышленности:

мясная - для смягчения мяса;

кожевенная - смягчение шкур;

кинопроизводство - растворение желатинового слоя при регенерации пленок;

парфюмерная - добавки в зубную пасту, кремы, лосьоны;

производство моющих средств - добавки для удаления загрязнений белковой природы;

медицина - при лечении воспалительных процессов, тромбозов и т.д.



## 1.8 Лекция № 8 (2 часа)

Тема: Применение достижений современной биотехнологии в агропромышленном производстве

### 1.8.1 Вопросы лекции:

1. Основные направления применения биотехнологии
2. Технология получения биогаза
3. Перспективы развития биотехнологий

### 1.8.2 Краткое содержание вопросов

#### 1. Основные направления применения биотехнологии

Основные направления биотехнологии. Биотехнология - это производство необходимых человеку продуктов и материалов с помощью живых организмов, культивируемых клеток и биологических процессов.

Возможности биотехнологии необычайно велики благодаря тому, что ее методы выгоднее обычных: они используются при оптимальных условиях (температуре и давлении), более производительны, экологически чисты и не требуют химических реактивов, отравляющих среду и др.

Объектами биотехнологии служат многочисленные представители групп живых организмов - микроорганизмы (вирусы, бактерии, протисты, дрожжи и др.), растения, животные, а также изолированные из них клетки и субклеточные структуры (органеллы). Биотехнология базируется на протекающих в живых системах физиолого-биохимических процессах, в результате которых осуществляются выделение энергии, синтез и расщепление продуктов метаболизма, формирование химических и структурных компонентов клетки.

Главными направлениями биотехнологии являются:

- 1) производство с помощью микроорганизмов и культивируемых эукариотических клеток биологически активных соединений (ферментов, витаминов, гормональных препаратов), лекарственных препаратов (антибиотиков, вакцин, сывороток, высокоспецифичных антител и др.), а также белков, аминокислот, используемых в качестве кормовых добавок;
- 2) применение биологических методов борьбы с загрязнением окружающей среды (биологическая очистка сточных вод, загрязнений почвы и т. и.) и для защиты растений от вредителей и болезней;
- 3) создание новых полезных штаммов микроорганизмов, сортов растений, пород животных и т. п.

Задачи, методы и достижения биотехнологии. Человечеству необходимо научиться эффективно изменять наследственную природу живых организмов, чтобы обеспечить себя доброкачественной пищей и сырьем и при этом не привести планету к экологической катастрофе. Поэтому не случайно главной задачей селекционеров в наше время стало решение проблемы создания новых форм растений, животных и микроорганизмов, хорошо приспособленных к индустриальным способам производства, устойчиво переносящих неблагоприятные условия, эффективно использующих солнечную энергию и, что особенно важно, позволяющих получать биологически чистую продукцию без чрезмерного загрязнения окружающей среды. Принципиально новыми подходами к решению этой фундаментальной проблемы является использование в селекции генной и клеточной инженерии.

Генная (генетическая) инженерия - раздел молекулярной генетики связанный с целенаправленным созданием новых молекул ДНК, способных размножаться в клетке-хозяине и осуществлять контроль за синтезом необходимых метаболитов клетки.

Возникнув на стыке химии нуклеиновых кислот и генетики микроорганизмов, генная инженерия занимается расшифровкой структуры генов, их синтезом и клонированием, вставкой выделенных из клеток живых организмов или вновь синтезированных генов в клетки растений и животных с целью направленного изменения их наследственных свойств.

## 2. Технология получения биогаза

Биогаз это один из ярких примеров того, как из отходов можно получить золото. Побочные продукты хозяйственной деятельности, после переработки превращаются в экологически чистое газообразное топливо. Данный цикл утилизации отходов позволяет построить замкнутое производство, на основе фермерского предприятия или городского очистительного сооружения.

Для того чтобы получить биогаз, понадобится специальное устройство: биогазовая установка. Она представляет собой комплекс инженерных сооружений, который состоит из агрегатов и емкостей, предназначенных для хранения и подготовки сырья, непосредственно самого производства биогаза, а также его сбора и очистки, выделения таких побочных продуктов переработки как сухая часть, которая используется для получения высококачественных минеральных удобрений и воды. Для получения электроэнергии биогазовая установка может быть совмещена с мини газотурбинным или другим типом генератора. Для получения не только электро, но и дополнительно тепловой энергии, биогазовый завод комплектуется когенерационными установками.

## 3. Перспективы развития биотехнологий

Возможности биотехнологии необычайно велики благодаря тому, что ее методы выгоднее обычных: они используются при оптимальных условиях (температуре и давлении), более производительны, экологически чисты и не требуют химических реактивов, отравляющих среду и др.

Объектами биотехнологии служат многочисленные представители групп живых организмов - микроорганизмы (вирусы, бактерии, протисты, дрожжи и др.), растения, животные, а также изолированные из них клетки и субклеточные структуры (органеллы). Биотехнология базируется на протекающих в живых системах физиолого-биохимических процессах, в результате которых осуществляются выделение энергии, синтез и расщепление продуктов метаболизма, формирование химических и структурных компонентов клетки.

Главными направлениями биотехнологии являются:

1) производство с помощью микроорганизмов и культивируемых эукариотических клеток биологически активных соединений (ферментов, витаминов, гормональных препаратов), лекарственных препаратов (антибиотиков, вакцин, сывороток, высокоспецифичных антител и др.), а также белков, аминокислот, используемых в качестве кормовых добавок;

2) применение биологических методов борьбы с загрязнением окружающей среды (биологическая очистка сточных вод, загрязнений почвы и т. и.) и для защиты растений от вредителей и болезней;

3) создание новых полезных штаммов микроорганизмов, сортов растений, пород животных и т. п.

Задачи, методы и достижения биотехнологии. Человечеству необходимо научиться эффективно изменять наследственную природу живых организмов, чтобы обеспечить себя доброкачественной пищей и сырьем и при этом не привести планету к экологической катастрофе. Поэтому не случайно главной задачей селекционеров в наше время стало решение проблемы создания новых форм растений, животных и

микроорганизмов, хорошо приспособленных к индустриальным способам производства, устойчиво переносящих неблагоприятные условия, эффективно использующих солнечную энергию и, что особенно важно, позволяющих получать биологически чистую продукцию без чрезмерного загрязнения окружающей среды. Принципиально новыми подходами к решению этой фундаментальной проблемы является использование в селекции генной и клеточной инженерии.

Генная (генетическая) инженерия - раздел молекулярной генетики связанный с целенаправленным созданием новых молекул ДНК, способных размножаться в клетке-хозяине и осуществлять контроль за синтезом необходимых метаболитов клетки. Возникнув на стыке химии нуклеиновых кислот и генетики микроорганизмов, генная инженерия занимается расшифровкой структуры генов, их синтезом и клонированием, вставкой выделенных из клеток живых организмов или вновь синтезированных генов в клетки растений и животных с целью направленного изменения их наследственных свойств.

## **2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ**

### **2.1 Лабораторная работа № 1 (2 часа)**

**Тема:** Трансформация бактерий *E. Coli* плазмидной ДНК

**2.1.1 Цель работы:** Изучить метод трансформации бактерий *E. Coli* плазмидной ДНК

#### **2.1.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику трансформации
2. Сделать выводы и предложения

#### **2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.1.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

### **2.2 Лабораторная работа № 2 (2 часа)**

**Тема:** Трансформация дрожжей плазмидной ДНК

**2.2.1 Цель работы:** Изучить метод трансформации бактерий *E. Coli* плазмидной ДНК

#### **2.2.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику трансформации
2. Сделать выводы и предложения

#### **3.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**3.1.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

### **2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа)**

**Тема:** Осаждение нуклеиновых кислот этанолом или изопропанолом

**2.3.1 Цель работы:** Изучить методику осаждения нуклеиновых кислот этанолом или изопропанолом

**2.3.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.3.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

**2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа)**

**Тема:** Определение количества двунитевой ДНК по флуоресценции БЭ

**2.4.1 Цель работы:** Научиться определять количества двунитевой ДНК по флуоресценции БЭ

**2.4.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.4.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

**2.5 Лабораторная работа № 5 (2 часа)**

**Тема:** Гель-электрофорез

**2.5.1 Цель работы:** Изучить методы использования гель-электрофореза

**2.5.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.5.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

## **2.6 Лабораторная работа № 6 (2 часа)**

**Тема:** Рестриктивный анализ ДНК

**2.6.1 Цель работы:** Изучить методы рестрикции и детекцию полученных результатов

**2.6.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.6.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

## **2.7 Лабораторная работа № 7 (2 часа)**

**Тема:** Полимеразная цепная реакция

**2.7.1 Цель работы:** Изучить методику постановки полимеразной цепной реакции

**2.7.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.7.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

## **2.8 Лабораторная работа № 8 (2 часа)**

**Тема:** Полимеразная цепная реакция

**2.8.1 Цель работы:** Изучить методику постановки полимеразной цепной реакции

**2.8.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

#### **2.8.4 Описание (ход) работы: Согласно поставленным задачам.**

### **2.9 Лабораторная работа № 9 (2 часа)**

**Тема:** Методика трансплантации эмбрионов

**2.9.1 Цель работы:** Изучить методику трансплантации эмбрионов

**2.9.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.9.4 Описание (ход) работы: Согласно поставленным задачам.**

### **2.10 Лабораторная работа № 10 (2 часа)**

**Тема:** Методика трансплантации эмбрионов

**2.10.1 Цель работы:** Изучить методику трансплантации эмбрионов

**2.10.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.10.4 Описание (ход) работы: Согласно поставленным задачам.**

### **2.11 Лабораторная работа № 11 (2 часа)**

**Тема:** Искусственное осеменение с.-х. животных

**2.11.1 Цель работы:** Изучить методику искусственного осеменения с.-х. животных

**2.11.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.11.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

## **2.12 Лабораторная работа № 12 (2 часа)**

**Тема: Клонирование**

**2.12.1 Цель работы:** Изучить методику клонирования

**2.12.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.12.4 Описание (ход) работы:** Согласно поставленным задачам.

## **2.13 Лабораторная работа № 13 (2 часа)**

**Тема: Методы оплодотворение яйцеклеток вне организма животного**

**2.13.1 Цель работы:** Изучить методы оплодотворение яйцеклеток вне организма животного

**2.13.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер



## **2. Презентация**

**2.13.4 Описание (ход) работы: Согласно поставленным задачам.**

### **2.14 Лабораторная работа № 14 (2 часа)**

**Тема: Биотехнология кормовых препаратов**

**2.14.1 Цель работы: Изучить биотехнология получения кормовых препаратов**

**2.14.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.14.4 Описание (ход) работы: Согласно поставленным задачам.**

### **2.15 Лабораторная работа № 15 (2 часа)**

**Тема: Биотехнология кормовых препаратов**

**2.15.1 Цель работы: Изучить биотехнология получения кормовых препаратов**

**2.15.2 Задачи работы:**

1. Изучить методику
2. Сделать выводы и предложения

**2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Персональный компьютер
2. Презентация

**2.15.4 Описание (ход) работы: Согласно поставленным задачам.**