

**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 заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций
1.1 Лекция № Л 1 Основы молекулярной биологии
1.2 Лекция № Л 2 Строение микроорганизмов
1.3 Лекция № Л 3 Биотехнология в животноводстве
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
2.9 Лабораторная работа № ЛР 3 Методика трансплантации эмбрионов
2.11 Лабораторная работа № ЛР 4 Искусственное осеменение с.-х. животных

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 «натуралистическая 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 отцовство и другие ДНК анализы выполняются легко и надежно. При стандартном анализе на установление отцовства, образцы ДНК собираются путем соскреба 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, повреждённой 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 расположеными 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, потеря, приобретение или

амплификация генетических элементов и установление новых взаимосвязей между уже имеющимися, но по-новому расположеннымми 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: Строение микроорганизмов

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, протозоные 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, вириоиды 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, *Prokaryotae* – предъядерные и *Eucaryotae* – ядерные (от греч. *a* – нет, *pro* – до, *ей* – хорошо, *полнотью*, *karyon* – ядро). К

первому относятся организованные частицы – вирусы и вириоиды, 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) аминоацилированные тРНК; 4) GTP в качестве источника энергии; 5) одновалентные (K^+ или $NH4^+$) 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, суспензируют 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 неспециальному 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), надраздел подцарства многоклеточных животных. Термин предложен О. Бючли в 1910. У Э., как правило, есть кишечник и ротовое отверстие, органы построены из тканей. Включают 2 раздела. Для лучистых, или радиальных (Radalia), 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 которым 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.

Лекция № 3 (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 totipotентности (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 разделения 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 приживляемость 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 бластоциты 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 осуществляли 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 пищат 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 был получен 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 обычными мышами того же возраста.

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
3. Реактивы

Среда LB:

1 % триптона
0.5 % дрожжевого экстракта
1 % NaCl
на 100 мл:
1 г триптона
0.5 г дрожж. экстракта
1 г NaCl

Раствор SST :

MgCl ₂	50 mM
KCl	100 mM
PEG3000	10%
DMSO	5%

2.1.4 Описание (ход) работы: Культура кишечной палочки обладает различной способностью к трансформации после обработки хлористым кальцием в разные периоды роста. В самом начале и конце роста культуры трансформантов почти не возникает. Наибольшее их число образуется, если берут клетки в середине-начале логарифмической фазы роста. Интересно, что именно на этот период падает максимальное снижение числа жизнеспособных клеток после соответствующих обработок. Тогда же наблюдается

наибольшее «истечение» ферментов, расположенных в периплазматическом пространстве из клеток во внешнюю среду. Таким образом, у *E. coli* имеется стадия роста, в которую может быть сообщена компетентность при трансформации, и в этот период клетки наиболее «хрупки». Оптимальное значение pH для трансформации при кальциевой методике равно 7-8.. При кальциевой методике применяется комбинация таких воздействий как выдерживание клеток на холода и их обработка хлористым кальцием. Хлористый кальций может быть заменен хлористым барием и хлористым рубидием. Инкубация при 37 °C обязательна для генетической трансформации. Ионы кальция действуют лишь при 37 °C, т.е. на заключительных этапах обработки клеток.

Быстрый метод трансформации бактерий *E. coli*

1. Приготовьте 3 мл ночной культуры (LB, 37 °C).
2. Внесите 30 мкл ночной культуры в 3 мл среды LB. Выращивайте клетки при 37 °C при интенсивном перемешивании до концентрации 5×10^7 кл/мл. Обычно это занимает 1.5-2 часа. Для штамма TG1 нужная концентрация соответствует коэффициенту OD550=0.6 для XL1 - OD550=0.4.
3. Осадите клетки центрифугированием (4000 об/мин, 1 мин).
4. Ресуспендируйте клетки в 300 мкл буфера SST.
5. Добавьте к 100 мкл компетентной культуры 10 мкл раствора ДНК. (Три раза пипетировать.)
6. Выдержите на льду 3-5 мин.
7. Перенесите пробы в термостат (42 °C, 40 сек).
8. Посейте по 50 мкл культуры на селективные чашки (LB+Amp (100 мкг/мл)).
9. Инкубируйте сутки при 37 °C.

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: ДНК очень легко ввести в клетки дрожжей. Для этого ферментативным способом удаляют целлюлозную клеточную стенку и получают так называемые «сферопласты». Сферопласты затем инкубируют с ДНК, CaCl₂ и полимерным спиртом (например, полиэтиленгликолем), который делает мембрану проницаемой и создает тем самым возможность для проникновения ДНК в клетки. После этого сферопласты инкубируют в среде, содержащей агар, где они восстанавливают клеточную стенку. Эффективность трансформации при этом составляет 2 x 10⁵/mg.

1. Зацепить с чашки примерно 50 ml клеток и суспендировать их в 1.5 ml микроцентрифужной пробирке в 1 ml стерильной воды.
2. Центрифугируя на микроцентрифуге клетки отмыть по разу в 1 ml стерильной воды и 0.5 ml 100 mM растворе LiAc.
3. Оценить объем осевших клеток и ресусPENDировать в равном объеме 100 mM раствора LiAc.
4. Добавить 5 ml ДНК-носителя (50 mg) и 5 mg плазмидной ДНК к 50 ml суспензии клеток и хорошо перемешиваем (Vortex).
5. Добавить 300 ml PEG/LiAc и перемешать (Vortex).
6. Тепловой шок (42оС, 20 мин).
7. Центрифугировать при максимальной скорости 10 сек, микропипеткой удалить PEG.
8. РесусPENDировать клетки в 1.0 ml стерильной воды и рассеять по 250 ml суспензии на 4 чашки с селективной средой.
9. Инкубировать чашки при 30оС в течение 3-4 дней

2.3 Лабораторная работа № 3 (2 часа)

Тема: Методика трансплантации эмбрионов

2.3.1 Цель работы: Изучить методику трансплантации эмбрионов

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
3. Шприц ШО-3М
4. Катерор

5. Чехол защитный со вставкой для и.о спермой замороженной в соломинках

2.3.4 Описание (ход) работы:

Отбор доноров и реципиентов

Коров-доноров выбирают из племенно-го стада, хорошо реагирующих на гормональную обработку и дающих биоло-гически полноценные эмбрионы. При отборе коров-доноров учитывают по-казатели молочной продуктивности, экстерьер и конституцию, желательный тип, линейную и породную принадлежность, что особенно важно для получения от этих животных высокооцененных быков. Кроме того, корова-донор должна иметь известное происхождение, подтвержденное по группам крови.

Молочная продуктивность коров-доноров должна составлять 7-12 тыс. кг молока в год, жирностью 3,6-4,3%.

Животные, признанные донорами, должны быть здоровыми, иметь среднюю или заводскую упитанность и ненарушенный обмен веществ, нормально циклировать. Тщательным клинико-гинекологическим исследованием у них исключают патологические процессы в репродуктивных органах (эндометрит, цервицит и др.), а также структурные изменения на почве пере-несенных болезней. Идеальный возраст коров для включения в группу доно-ров - 4-5 лет. По достижении 8-летнего возраста суперовуляторный ответ на-чинает снижаться.

Суперовуляция

Известно, что количество первичных фолликулов в яичниках половозрелой телки колеблется от 100 тыс. до 1 млн. Однако в про-цессе онтогенеза лишь небольшая часть из них реализуется в виде потомков. Остальные же овоциты подвергаются атрезии (обратному развитию) и в вос-производстве не участвуют.

Суперовуляцией (множественной овуляцией, полиовуляцией) называют состояние, вызванное гормонами, когда в яичниках животных развивается и овулирует в несколько раз больше яйцеклеток, чем при естественных усло-виях.

Метод суперовуляции разработал наш соотечественник М.М. Завадов-ский (1934). Он установил, что при введении сыворотки жеребых кобыл /СЖК/ у самок возрастает количество созревших фолликулов. В настоящее время все методы индукции овуляции основаны на использовании гормо-нальных препаратов. В зависимости от вида животных число овулирующих яйцеклеток может быть увеличено в 3-8 и даже в 50 раз. С помощью супер-овуляции становится возможным получение большого количества эмбрионов от лучших по продуктивности животных.

Гонадотропин СЖК лучше всего применять в середине полового цикла: с 8-го по 15-16 день. Препараты вводят однократно в дозе от 2 тыс. до 3 тыс. ИЕ. Через 48 ч после введения ГТЖК инъецируют простагландин ПГФ2 или одно из его синтетических аналогов. Обычно через 2 дня наступает стадия возбуждения полового цикла с проявлением течки, охоты и овуляции. В этот период осеменяют коров-доноров.

Синхронизация охоты и овуляции у донора и реципиентов.

Для того чтобы обеспечить синхронную охоту и овуляцию у донора и реципиентов применяют лютеолитические гормоны (эстрофан, супер-фан и др.) путем двойной (с интервалом 2 суток) внутримышечной инъекции реципиентам с таким расчетом, чтобы повторное введение приходилось на 3-й день от начала обработки ФСГ супер коров - доноров.

За обработанным поголовьем ведут наблюдения для своевременного обнаружения течки, общей половой реакции, охоты. Реципиента закрепляют за донором когда полностью совпадают сроки начала охоты.

Пересадка эмбрионов.

Перед эмбриопересадкой реципиента фиксируют в станке, хвост бинтуют и подвязывают к шее, вульву и промежность моют теплой водой с мылом, дезинфицируют септонексом. Животному делают низкую сакральную эпидуральную анестезию. Для блокирования рецепторов матки и предотвращения реакции отторжения эмбриона сильно возбудимым животным вводят внутримышечно 10 мл ханегифа или другой маточный релаксант.

Пересадку эмбрионов производят следующим образом. Подготовленный катетер Кассу вводят во влагалище, затем под контролем руки, находящейся в прямой кишке, продвигают через цервикальный канал до середины рога на стороне яичника с желтым телом. Убедившись в правильности расположения прибора, медленно выталкивают содержимое пайеты в просвет рога матки.

Реципиентам после пересадки эмбрионов обеспечивают полноценное кормление ежедневно предоставляют активный мотив. Через 2-3 месяца после пересадки проводят ректальное исследование на стельность.

2.4 Лабораторная работа № 4 (2 часа)

Тема: Искусственное осеменение с.-х. животных

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

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: Для осеменения коров и телок сперму вводят в шейку матки. Существует 3 способа введения ее: ректоцервикальный, маноцервикальный и визоцервикальный.

Независимо от способа введения спермы оператор обязан:

- проводить осеменение коров и телок на пункте;
- быть в чистом халате, с коротко подстриженными ногтями рук;
- следить, чтобы привод коров и телок на пункт и фиксация их в станке были безболезненными и не вызывали стрессовых реакций;
- обмывать и обтират наружные половые органы у животных;
- перед осеменением осторожным вращением флакона или другой упаковки со спермой кратковременного хранения или оттаянную в растворе лимоннокислого натрия сперму в ампулах, флаконах хорошо смешать и проверить на подвижность спермиев.

Ректоцервикальный способ. Корове или телке сперму вводят с помощью стерильных одноразовых пластмассовых или стеклянных инструментов в шейку матки, фиксируя ее рукой через прямую кишку.

Положительное влияние на оплодотворяемость коров и телок оказывает массаж половых органов в процессе осеменения, который снимает ответную реакцию самки на введение инструментов в половые пути, а также усиливает моторику матки, что способствует продвижению спермиев к яйцеводам и наступлению овуляции.

Для осеменения коров и телок спермой в облицованных гранулах применяют специальный инструмент, который состоит из металлического трубчатого корпуса, проволочного стержня с дисковым упором и защитного чехла. Один конец корпуса снабжен круглым фланцем для фиксации удлинителя пальцами, а другой - наружной резьбой для соединения с инструментом.

Перед осеменением инструмент собирают в такой последовательности. Подготовленную гранулу со спермой вкладывают в канал одноразового катетера, который присоединяют к удлинителю. Поршнем толкателя спермодозу досыпают до переднего упора. В таком виде удлинитель с наконечником помещают в тонкостенный полимерный чехол, один конец которого запаян и имеет сужение, а другой - фиксируют в подвижном

замке. Через выходное отверстие наконечника инструмента делают прокол гранулы со спермой стерильной иглой.

Подготовленный инструмент вводят в половые пути самки. После прохождения влагалища наконечник устройства освобождают от чехла, одновременно вводя его в цервикальный канал самки. Снятие чехла производят путем сдвигания его в направлении, противоположном движению инструмента при помощи подвижного замка, в котором зафиксирован свободный конец полимерного чехла.

При введении наконечника в цервикальный канал на достаточную глубину выдавливают сперму путем нажатия на упорную кнопку толкателя.

После осеменения катетер вместе с чехлом удаляют, а удлинитель используют для последующих осеменений в том же порядке без дополнительной стерилизации. При использовании упрощенного удлинителя защитный чехол не применяют.