

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології**

Кафедра біотехнології та біоінженерії

БІОБЕЗПЕКА ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ

методичні рекомендації

для виконання лабораторно-практичних робіт для здобувачів першого
(бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Біотехнології та біоінженерія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» денної форми здобуття вищої
освіти

**Миколаїв
2024**

УДК 608.3

Б 63

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету ТВШПТСБ Миколаївського національного аграрного університету від 30.10.2024 р., протокол №2.

Укладачі:

О. І. Юлевич – кандидатка т. наук, доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

І. М. Люта – асистентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

Рецензенти:

О. І. Каратєєва – кандидатка с.-г. наук, доцентка, в.о. завідувачки кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету.

Зміст

Вступ	4
Основні вимоги та правила техніки безпеки у лабораторії біотехнології	5
Управління ризиком в ході біотехнологічних досліджень	8
Тест Еймса: загальні положення та методика проведення	18
Allium-тест: основні положення та методика проведення	24
Біологічне очищення стічних вод за допомогою активного мулу	32
Методи отримання нуклеїнових кислот	35
Мікроклональне розмноження рослин	40
Трансгенні риби	46
Трансгенні птахи	53
Генетично модифіковані організми і біобезпека	58
Вивчення захисної дії кріопротекторів на стійкість клітин до дії низьких температур	64
Особливості вимивання ембріонів	68
Пошук та морфологічна оцінка ембріонів	73
Нехірургічна трансплантація ембріонів	78
Законодавча база України з біобезпеки та її реалізація	81
Література	89

Вступ

Біобезпека вивчає спадковість і мінливість організмів з новими штучно утвореними ознаками, а також їх розповсюдження і можливі наслідки для екобіоценозів. Захист спадковості живого – це збереження життя на Землі у всьому його розмаїтті, його еволюції.

У зв'язку із зростанням взаємодії людини і природи, посиленням дії екзогенних факторів на спадковість живого, створенням нових генетично модифікованих організмів виникла проблема екологічних змін у навколишньому середовищі, що викликані її забрудненням і появою та розповсюдженням сучасних біотехнологій різного напрямку, включаючи і створення трансгенних організмів. Люди повинні знати наслідки неконтрольованої дії мутагенних факторів, що з'являються в довкіллі, на спадковість живих організмів; розуміти проблеми, що пов'язані з активним залученням генетично модифікованих організмів до вирішення проблем недостатчі харчових продуктів в країнах третього світу, очищення навколишнього середовища від токсикантів різної хімічної природи, синтезу та отримання фармакологічних препаратів, покращення якості вже існуючих сортів рослин та порід тварин, використання рослин як фабрик для направленої хімічної синтезу тих чи інших сполук і т.д.

Дисципліна займає одне з основних місць і відіграє важливу роль в формуванні біотехнолога. Без твердих знань біобезпеки біотехнологи не може бути допущений до організації, керівництва та безпосереднього виконання робіт на виробництві. Знання, отримані при вивченні дисципліни «Біобезпека використання біотехнологій» студенти використовують в навчанні – лабораторно-практичних заняттях, при проходженні всіх видів практик, а потім, будучи біотехнологом, постійно в своїй трудовій діяльності.

ТЕМА: ОСНОВНІ ВИМОГИ ТА ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У ЛАБОРАТОРІЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з правилами поведінки у лабораторії біотехнології

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Перед проведенням лабораторної роботи студенти зобов'язані теоретично підготуватися до відповідної теми, використовуючи рекомендовану літературу.

Працювати у лабораторії студент може тільки в присутності викладача або лаборанта.

У лабораторії слід дотримуватися тиші, чистоти, порядку розміщення обладнання, апаратури та реактивів. Забороняється виносити реактиви з приміщення, переносити їх з-під витяжної шафи.

Під час роботи в асептичному приміщенні необхідно щільно закрити вікна і двері та одягти стерильний халат, шапочку або пов'язку. Провести дезінфекцію рук 96% етиловим спиртом. Протерти 96% етиловим спиртом робочі поверхні столів ламінар-боксів, близько розташовані електророзетки, пальники.

Усі досліди з отруйними речовинами або сполуками, що мають неприємний запах, слід проводити під витяжною шафою. Розігрівання живильного середовища необхідно проводити на водяній бані і розливати в колби, пробірки, пеніцилінові флакончики при температурі +45-50 °С.

Рідину в пробірці необхідно перемішувати за допомогою скляної палички. Уникати зайвих рухів над відкритими чашками Петрі. Проводячи висаджування рослинного матеріалу, посуд тримати під кутом, щоб уникнути прямого попадання пилу.

Посадку рослинного матеріалу проводять якнайшвидше, зменшуючи до мінімуму час, за якого культуральний посуд залишається відкритим.

Після закінчення роботи пробки культурального посуду накривають целофановими ковпачками. Бокові грані чашок Петрі заклеюють липкою стрічкою.

Під час роботи з концентрованими кислотами їх слід вливати у воду невеликими порціями, користуючись гумовими рукавичками.

Не слід пробувати реактиви на смак, втягувати піпеткою до рота розчин

невідомої сполуки, оскільки вона може бути отруйною, вдихати глибоко виділені гази або випари.

Реактиви необхідно зберігати у закритому посуді з етикеткою, де зазначена назва, формула і концентрація речовини.

Забороняється виливати у раковини вмивальників залишки розчинів, що містять концентровані кислоти. Їх слід зливати у спеціальні ємності, які знаходяться під витяжною шафою або поряд із раковиною вмивальника.

Працювати з реактивами, що подразнюють органи дихання або мають сильний запах, слід під витяжною шафою.

Сипкі реактиви треба набирати спеціальними ложечками або шпателем.

Під час роботи у лабораторії категорично забороняється залишати без нагляду установки, що працюють, а також електричні нагрівальні прилади.

Використані фільтри, папір, вату розбитий лабораторний посуд та уламки скла не викидати у раковини вмивальників. Необхідно користуватись ємностями, які знаходяться поряд з раковиною.

У разі виникнення пожежі необхідно: негайно вимкнути рубильники електромережі, прибрати у безпечне місце горючі речовини, вогнегасником загасити полум'я або засипати піском чи накрити азбестовим покривалом.

У разі виникнення пожежі в ламінар-боксі забороняється використовувати вогнегасник, полум'я необхідно загасити азбестовим покривалом або вологою ганчіркою.

Виходячи з лабораторії, обов'язково слід вимкнути електронагрівальні прилади, закрити водопровідний кран і витяжну шафу.

Правила техніки безпеки в біотехнологічному практикуму

1. Практичні роботи необхідно виконувати в спецодязгу (халаті), захищаючи одяг та шкіру від попадання агресивних реактивів та обсіменіння мікроорганізмами.
2. Кожний студент повинен працювати на закріпленому за ним робочому місці.
3. Робоче місце слід підтримувати в чистоті, не захаращувати його посудом і побічними речами.
4. Забороняється виконувати практичні роботи без присутності викладача.
5. До виконання кожної роботи студенти можуть приступити тільки після отримання інструктажу з техніки безпеки та дозволу викладача.
6. Приступаючи до роботи, необхідно усвідомити методику роботи, правила її безпечного виконання.
7. Дослід необхідно проводити в точній відповідності з його описом у

методичних рекомендаціях, особливо дотримуватися черги додавання реактивів.

8. Для виконання досліду користуватися тільки чистим, сухим лабораторним посудом; для відмірювання кожного реактиву потрібно мати мірний посуд (піпетку, бюретку, мензурку, мірний циліндр або мірний стакан); не слід виливати надлишок налитого в пробірку реактиву назад у склянку, щоб не забруднити реактив.

9. Якщо у ході досліду потрібне нагрівання реакційної суміші, то треба дотримуватися передбаченого способу нагрівання: на водяній бані, на електроплитці та ін. Сильно леткі пальні речовини небезпечно нагрівати на відкритому вогні.

10. Пролиті на підлогу та стіл хімічні речовини знешкоджувати і прибирати під керівництвом лаборанта (викладача) відповідно до правил.

11. Виконувати роботу необхідно акуратно, сумлінно, уважно, ощадливо, бути спостережливим.

12. Після закінчення роботи слід привести в порядок своє робоче місце: помити посуд, протерти поверхню стола, закрити водопровідні крани, виключити електричні прилади.

Правила техніки безпеки при роботі з біоб`єктами

1. У лабораторії забороняється приймати їжу, пити воду.

2. Роботу з біологічним матеріалом проводити тільки інструментами.

3. При випадковому попаданні біологічного матеріалу (особливо мікроорганізмів) на стіл, руки, потрібно провести обробку дезинфекційним розчином (наприклад, хлораміном).

4. Після роботи необхідно ретельно вимити руки з використанням дезинфекційних засобів (детергентів).

Лабораторний посуд

Всі роботи у лабораторіях здійснюються з використанням різного хімічного посуду або приладів. Набір посуду (скляного, фарфорового або з пластмас) залежить від характеру роботи, що проводиться.

Скляний хімічний посуд розділяється на три основних групи:

– посуд загального призначення – застосовується в будь-якій хімічній лабораторії для різноманітних цілей;

– посуд спеціального призначення – використовується з будь-якою однією метою;

– мірний посуд, призначений для відмірювання точних об`ємів рідин, розчинів та газів.

До посуду загального призначення відносяться: пробірки, хімічні лійки, хімічні

стакани, плоскодонні (круглі) колби, конічні колби (Ерленмейєра), крапельниці, скляні холодильники.

Посуд спеціального призначення застосовується в особливих дослідних роботах, органічних та неорганічних синтезах. До нього відносяться, наприклад, чашка Петрі, качалочна колба, фарфорова ступка з товкачиком та ін.

Мірний посуд застосовується для відмірювання об'ємів рідин: мірні циліндри, піпетки, бюретки, мірні колби та стакани.

ТЕМА: УПРАВЛІННЯ РИЗИКОМ В ХОДІ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: вивчити групи біологічних ризиків, які можуть виникати в ході біотехнологічних досліджень.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Класифікація джерел емісії біологічного фактора за групами ризику. Принцип біологічної безпеки лабораторного обладнання.

Відповідно до Принципу біологічної безпеки лабораторного обладнання в ході наукових досліджень, розробки нових технологій та їх використання необхідно забезпечити обмеження поширення або запобігання витоку емісії біологічних агентів з лабораторного середовища, де з ними виробляють різні маніпуляції або підтримують в культурі; інфіковані матеріали повинні бути знешкоджені або знищені в самій лабораторії. Обмеження поширення носіїв чужорідної генетичної інформації має на увазі

- первинне обмеження поширення – захист персоналу лабораторії та безпосередньо середовища лабораторії від впливу інфекційних агентів, забезпечується використанням мікробіологічних методів та спеціального обладнання, яке гарантує безпечну роботу і

- вторинне обмеження поширення – захист навколишнього середовища від впливу біологічного агента, забезпечується комбінацією технологічної конструкції лабораторії та робочими операціями. Відповідно до вимог Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) до біотехнологічних лабораторій рівні ризику при лабораторних дослідженнях поділяються на чотири групи:

- **ГРУПА РИЗИКУ 1** (відсутність або низька індивідуальна та суспільна небезпека) – агенти, які потенційно не є збудниками хвороб людини або тварин;

• **ГРУПА РИЗИКУ 2** (помірна індивідуальна небезпека, низька суспільна небезпека) – патогенний агент, який може викликати захворювання людини або тварин, але не становить серйозного ризику для лабораторного персоналу, населення, домашніх тварин або навколишнього середовища. необережність при проведенні робіт в лабораторії може викликати 41 захворювання, але існує можливість проведення лікувально – профілактичних заходів. Ризик поширення обмежений;

• **ГРУПА РИЗИКУ 3** (високий індивідуальний та низький суспільний ризик) – патогенний агент, який зазвичай викликає захворювання людини або тварин, існує можливість проведення лікувально-профілактичних заходів. не поширюється від хворого до здорового;

• **ГРУПА РИЗИКУ 4** (високий індивідуальний та суспільний ризик) – патогенний агент, який викликає серйозні захворювання у людини або тварин. Передається від хворого до здорового прямо або опосередковано. У більшості випадків відсутні ефективні лікувально-профілактичні заходи. В основі цієї класифікації лежить поєднання двох критеріїв – величини індивідуального та соціального ризику.

Позначення біотехнологічних лабораторій за рівнем біобезпеки. Взаємозв'язок групи ризику та рівнів біобезпеки, практики та обладнання

Класифікація лабораторій за рівнем біобезпеки проводиться з урахуванням їх призначення, конструкції, використовуваного обладнання та засобів, практики та оперативних процедур, необхідних для роботи з агентами, що належать до різних груп ризику. Відповідно до групи ризику позначають три категорії біотехнологічних лабораторій за рівнем біобезпеки:

- *базові* – рівень біобезпеки 1 та 2;
- *ізолювані* – рівень біобезпеки 3 та 4;
- *максимально ізолювані* – рівень біобезпеки 4.

1) **Базові ЛАБОРАТОРІЇ** – *рівень біологічної безпеки 1 та 2.*

Доступ:

1. На дверях кімнат, де проводяться роботи з мікроорганізмами групи ризику 2 повинен бути зображений міжнародний знак біологічної небезпеки (рис. 1);
2. В робочу зону лабораторії повинні допускатися лише особи, які мають відповідний дозвіл;
3. Двері лабораторії слід тримати закритими;
4. У робочих зонах лабораторії неприпустимо перебування дітей;

5. Допуск до віварію дозволяється тільки спеціальному персоналу;
6. Тварин, з якими не проводиться безпосередня робота, слід тримати поза лабораторією.



Рис.1. Міжнародний знак біологічної небезпеки

Захист персоналу:

1. Для роботи в лабораторії завжди слід носити спеціальний одяг або халати;
2. При кожній процедурі, яка може супроводжуватися прямими або випадковими контактами з кров'ю, рідинами організму та іншими потенційними інфекційними матеріалами або зараженими тваринами, слід надягати спеціальні рукавички. Після їх використання рукавички слід знімати асептично та мити руки;
3. Працівники лабораторії повинні мити руки кожен раз після маніпуляцій з інфікованими матеріалами й тваринами, а також в кінці робочої зміни;
4. При необхідності захистити очі та обличчя від бризок, попадання інфікованого матеріалу та джерел штучної та ультрафіолетової радіації слід надягати захисні окуляри, лицеві щітки чи інші захисні засоби;
5. Носити захисний одяг поза лабораторних приміщень, а саме в їдальні, буфеті, службових приміщеннях, бібліотеках, кімнатах персоналу та туалетах забороняється;
6. У лабораторіях можна носити взуття з відкритими носками;
7. У лабораторній зоні не дозволяється приймати їжу та пити, курити, застосовувати косметичні засоби та використовувати контактні лінзи;
8. У робочій зоні лабораторії зберігання їжі та напоїв заборонено;
9. Захисний лабораторний одяг не повинен зберігатися в тих же шафах або ящиках, що та особисті речі.

Процедури:

1. Піпетування ротом повинно бути суворо заборонено;
2. Суворо забороняється брати до рота біологічні матеріали та лизати наклейки;
3. Всі технічні процедури слід проводити таким чином, щоб мінімізувати можливість утворення аерозолів;
4. Використання шприців та голок має бути обмежено; Їх використання для забору вмісту з місткостей або в інших цілях (крім використання для парентеральних ін'єкцій та аспірації рідини у лабораторних тварин) має бути заборонено;
5. Про всі випадки розлиття інфекційного матеріалу, ситуації, що можуть призвести до невизначених наслідків, підозри про наявність контакту з інфекційними матеріалами слід негайно доповідати керівнику лабораторії; Необхідно підготувати письмовий звіт про подію;
6. Необхідно розробити та дотримуватись письмової процедури очищення після розлиття будь-яких інфекційних матеріалів;
7. Інфіковані рідини повинні бути знезаражені (хімічним або фізичним шляхом) до їх скидання в систему каналізації; Залежно від оцінки ризику, проведеної для використовуваних патогенних агентів, може знадобитися відповідна система очищення стічних вод;
8. Письмові документи, які, як очікується, будуть використовуватися поза лабораторії, повинні бути захищені від інфекції на території самої лабораторії.

Робочі зони лабораторії:

1. У лабораторних приміщеннях слід підтримувати порядок та чистоту, в них не повинно бути матеріалів, що не мають відношення до роботи;
2. Робочі поверхні слід дезінфікувати після забруднення потенційно небезпечним матеріалом та в кінці робочої зміни;
3. Всі контаміновані матеріали, проби та культури повинні бути деконтаміновані перед видаленням з лабораторії або повторним використанням;
4. Пакування та транспортування зразків повинні проводитися відповідно до національних та / або міжнародних норм та правил, що існують;
5. Вікна, які відкриваються, повинні бути забезпечені протимоскітними сітками.

Забезпечення біобезпеки:

1. Завідувач лабораторією (особа, яка несе безпосередню відповідальність за лабораторію) відповідає за розробку й прийняття плану забезпечення біобезпеки, або керівництва з безпеки, або робочих процедур;

2. Керівник лабораторії (який підзвітний завідувачу лабораторією) відповідає за навчання персоналу техніці безпеки лабораторних робіт;

3. Персонал повинен бути проінформованим про особливості роботи з небезпечним матеріалом, а також зобов'язаний ознайомитися з відповідними інструкціями щодо застосування стандартних правил та техніки безпеки робіт та дотримуватися їх. Керівник лабораторії повинен бути впевнений, що персонал їх розуміє. У лабораторії повинен бути екземпляр інструкції з застосування стандартних правил та техніки безпеки;

4. Слід розробити програми, що визначають порядок роботи з членистоногими та гризунами;

5. У разі необхідності слід забезпечити відповідну медичну оцінку, спостереження та лікування та вести медичну документацію.

Проектування лабораторії та лабораторні приміщення. При проектуванні та оснащенні лабораторії, призначеної для певного типу робіт особливу увагу необхідно приділяти проблемам, які можуть бути викликані умовами роботи. Вони включають:

1. Утворення аерозолів;
2. Роботу з великими обсягами та/або високими концентраціями мікроорганізмів;
3. Тісноту та наявність в лабораторії занадто великої кількості обладнання;
4. Інвазії гризунів та членистоногих;
5. Вхід в лабораторію осіб, які не мають на це право;
6. Послідовність робочого процесу: використання конкретних зразків та реагентів.

Лабораторне обладнання

1. має бути сконструйоване таким чином, щоб обмежити або запобігти контакту працівника з інфекційним агентом;

2. має бути виготовлено з матеріалів, в які не просочуються рідини, стійких до корозії та тих, що задовольняють вимогам механічної міцності;

3. не повинно мати гострих країв, шорсткостей та незакріплених деталей;

4. повинно бути сконструйовано та встановлено таким чином, щоб забезпечувати просте звернення та технічне обслуговування, очищення, деконтамінацію та контроль з метою сертифікації; використання виробів зі скла та інших тендітних матеріалів потрібно, якщо є така можливість, уникати.

Основне обладнання із забезпечення біобезпеки

1. Пристосування для піпетування – для виключення піпетування ротом;
2. Бокси для забезпечення біологічної безпеки, використовуються в тому випадку, якщо:
 - йде робота з інфекційними матеріалами; подібні матеріали можна піддавати центрифугуванню у звичайній лабораторії при використанні герметичних безпечних центрифужних пробірок в тому випадку, якщо пробірки наповнюються та випорожнюються в боксі біологічної безпеки;
 - існує підвищена небезпека передачі інфекції повітряно крапельним шляхом;
 - йдуть роботи, пов'язані з високим ризиком утворення аерозолів, зокрема центрифугування, подрібнення, змішування, інтенсивне струшування або перемішування, ультразвукове дроблення, розтин контейнерів з інфекційним матеріалом, внутрішній тиск в яких відрізняється від атмосферного, інтраназальна щеплення тварин, а також забір інфікованого матеріалу у тварин та ембріонів;
3. Одноразові пластикові петлі для пересіву. Як варіант, з метою знизити можливість утворення аерозолів в біобезпечних боксах можна використовувати електричні сміттєспалювачів для знищення петель для пересіву;
4. Судини та пробірки з кришками;
5. Автоклави або відповідні кошти для деконтамінації заражених матеріалів;
6. Якщо є можливість, використовувати одноразові пластикові пастерівські піпетки замість скляних;
7. Таке обладнання, як автоклави та бокси біологічної безпеки, повинно бути змонтовано, до введення в експлуатацію, сертифіковане за допомогою відповідних методів. Повторна сертифікація повинна проводитися через певні інтервали відповідно до інструкції заводу-виготовлювача.

2) **ІЗОЛЬОВАНА ЛАБОРАТОРІЯ** – рівень біологічної безпеки 3.

Кодекс практики

1. На дверях робочих приміщень лабораторії вивішують міжнародні знаки та символи, що попереджають про біологічну небезпеку із зазначенням рівня біологічної безпеки та прізвища керівника лабораторії, яка здійснює контроль за доступом, а також про особливі умови входу до лабораторії (імунізація, тощо);
2. У лабораторії необхідно носити спеціальний одяг типу закритих спереду халатів, робочі костюми, спецодяг, шапочки, при необхідності, бахіли або взуття спеціального призначення. Стандартні халати, що застібаються спереду, надягати небажано, як та халати з коротким рукавом. Лабораторний одяг забороняється носити поза лабораторією, перед пранням він підлягає деконтамінації. Зняття

особистого одягу та переодягання в лабораторний одяг спеціального призначення цілком виправдано при роботі з деякими патогенними агентами (наприклад, з сільськогосподарськими та зоонозними агентами);

3. Відкрита маніпуляція з усіма потенційно інфекційними матеріалами повинна проводитися в біологічно безпечних боксах або інших первинних ізоляційних пристосуваннях;

4. При необхідності, в приміщеннях, де утримуються тварини, інфіковані деякими патогенними агентами, слід надягати захисні респіраторні пристосування.

Проектування лабораторії та лабораторні приміщення

1. Лабораторія повинна бути відокремлена від інших частин будівлі, в яких дозволений вільний прохід. Додаткова ізоляція досягається за допомогою розміщення лабораторії в тупиковому кінці коридору з використанням внутрішніх перегородок та дверей або ж вестибюля (тобто подвійні двері тамбура або базової лабораторії 2-го рівня біологічної безпеки), що являє собою специфічну зону, призначену для підтримки різниці тиску між лабораторією та прилеглими приміщеннями. Вестибюль повинен бути оснащений засобами для сортування чистого та брудного одягу і, в разі необхідності, душем;

2. Двері вестибюля повинні бути такими, що зачиняються та блокуються, з тим щоб вони могли відкриватися поперемінно;

3. Поверхня стін, підлоги та стелі повинна бути водостійкою та легко митися. Отвори та щілини на цих поверхнях (наприклад, для відвідних труб) повинні бути герметично закладені для забезпечення деконтамінації приміщень;

4. Лабораторні кімнати повинні бути герметизовані для запобігання контамінації. З цією ж метою проектується та система вентиляції;

5. Вікна повинні бути закриті, герметизовані та оснащені склами, що не б'ються;

6. У вихідній двері кожної лабораторії повинні бути обладнані автоматичні крани для миття рук;

7. Необхідно встановити керовану систему вентиляції для забезпечення негативного тиску всередині лабораторії, з тим щоб повітря йшло в бік робочих приміщень лабораторії. Необхідно також встановити засоби візуального контролю з сигналом тривоги або без нього, з тим щоб персонал міг контролювати правильний напрямок струму повітря в бік робочих приміщень лабораторії;

8. Система вентиляції повинна бути спроектована таким чином, щоб повітря з ізолюваної лабораторії 3-го рівня біологічної безпеки не потрапляло в інші

приміщення. Повітря може піддаватися фільтрації за допомогою фільтрів тонкого очищення типу HEPA, рекондиціюванню та рециркуляції в межах самої лабораторії. Відпрацьоване повітря з лабораторії, що не циркулювало в боксах біологічної безпеки, повинно виходити з будинку назовні з таким розрахунком, щоб воно мало змогу розсіюватися далеко від службових та житлових будівель або отворів для забору свіжого повітря;

9. Усі фільтри повинні бути встановлені таким чином, щоб можна було здійснювати контроль та деконтамінацію газів;

10. Бокси біологічної безпеки (БББ) повинні бути розташовані далеко від проходів та поза потоків повітря від входних дверей та вентиляційних систем;

11. Пропущене через фільтри повітря з боксів біологічної безпеки класу I та II повинно відводитись назовні таким чином, щоб не допускати зміни повітряного балансу в боксах та розсіюватися далеко від отворів для забору свіжого повітря;

12. Автоклав для деконтамінації відходів повинен бути розташований всередині лабораторії. Якщо з ізолюваної лабораторії необхідно видалити інфіковані відходи, що підлягають деконтамінації або знищення, то їх необхідно транспортувати в закритих, герметичних вдаростійких контейнерах з дотриманням, у відповідних випадках, національних або міжнародних норм та правил;

13. Система водопостачання повинна бути оснащена запірними пристроями, що перешкоджають протитечі. Вакуумні магістралі повинні бути захищені за допомогою уловлювачів рідких дезінфекційних засобів та HEPA фільтрів або аналогічних пристроїв. Альтернативні вакуумні насоси також повинні бути належним чином захищені за допомогою відповідних уловлювачів та фільтрів;

14. У ізолюваних лабораторіях 3-го рівня біологічної безпеки схеми будівель та операційні процедури повинні бути оформлені документально. 47

Лабораторне обладнання. Маніпуляції з усіма потенційно інфекційними матеріалами повинні проводитися в боксах біологічної безпеки або інших первинних ізоляційних пристроях.

Медичний контроль та спостереження за здоров'ям:

1. Медичне обстеження всього персоналу, що працює в ізолюваній лабораторії 3-го рівня біологічної безпеки, є обов'язковим. Це обстеження містить реєстрацію даних, що належать до історії хвороби, та медичний огляд;

2. Після отримання задовільних результатів медичного обстеження обстежуваний повинен отримати картку екстреної консультації, яка засвідчує, що він працює в ізолюваній лабораторії 3-го рівня біологічної безпеки.

3) **МАКСИМАЛЬНО ІЗОЛЬОВАНА ЛАБОРАТОРІЯ** – *рівень біологічної безпеки 4.*

Кодекс практики

1. Необхідно застосовувати правило «роботи в парах», згідно з яким в лабораторії не допускається робота поодинці. Це особливо важливо при роботі в лабораторії 4-го рівня біологічної безпеки з використанням ізоляційних засобів індивідуального захисту;

2. Перед тим як увійти в лабораторію або вийти з неї співробітники повинні повністю переодягнутися та перевзутися;

3. Співробітники повинні бути навчені заходам аварійної евакуації в разі індивідуальних травм або хвороби;

4. Для повсякденної роботи необхідно встановити систему зв'язку між персоналом, що працює в максимально ізольованій лабораторії 4-го рівня біологічної безпеки, та допоміжним персоналом поза лабораторією.

Проектування лабораторії та лабораторні приміщення

1. Первинна ізоляція. Ефективна первинна ізоляція забезпечується на місці шляхом використання одного або декількох з перерахованих нижче засобів:

- Лабораторія біологічної безпеки класу III. При вході необхідно пройти через двоє дверей, щоб потрапити в приміщення, в яких розташовані бокси біологічної безпеки класу III.

- Лабораторія з використанням ізоляційних засобів індивідуального захисту. Персонал, перш ніж увійти в робочу зону, де виробляються маніпуляції з інфікованими матеріалами, попередньо проходить через роздягальні та зону деконтамінації. У зв'язку з цим необхідно обладнати душові кабінки для співробітників. Для його використання в можливих екстрених ситуаціях повітря в захисний костюм повинно подаватися системою, яка має 100-відсоткову автономність та незалежне джерело повітря. Вхід в лабораторію з використанням ізоляційних засобів індивідуального захисту проводиться через повітряний шлюз, забезпечений повітронепроникними дверима. На випадок збою в роботі механічної системи або системи подачі повітря необхідно передбачити відповідну систему оповіщення персоналу, що працює в таких лабораторіях;

2. Регульований доступ. Максимально ізольована лабораторія 4-го рівня біологічної безпеки повинна розташовуватися в окремому будинку або в чітко відокремленій зоні в межах будівлі, що охороняється. Переміщення персоналу та робочих матеріалів в лабораторію та з неї здійснюється через систему повітряних

шлюзів. При вході персонал повністю переодягається, при виході приймає душ та знову одягає повсякденний одяг;

3. Регульована система подачі повітря. У лабораторії необхідно підтримувати негативний тиск. Підведення та відведення повітря повинно проводитися через НЕРА-фільтри;

4. Деконтамінація відходів. Перед остаточним видаленням всіх відходів з лабораторії з використанням ізоляційних засобів індивідуального захисту, камери деконтамінації, дезінфікаційного душа або боксів біологічної безпеки класу III їх необхідно знешкодити. Кращим методом є їх термічна обробка. У деяких випадках перед видаленням необхідно провести нейтралізацію рН відходів;

5. Стерилізація відпрацьованих матеріалів. Лабораторія повинна бути оснащена тамбурами з подвійними дверима та наскрізними автоклавами. Крім того, необхідно передбачити інші методи деконтамінації обладнання та предметів, що не піддаються стерилізації паром;

6. Вхідні повітряні шлюзи. Вони необхідні для зразків, матеріалів та тварин;

7. Аварійне джерело живлення та окрема лінія електропостачання;

8. Ізоляційні стоки.

На закінчення наведемо характеристику рівнів ризику при роботі з лабораторними тваринами:

Рівень 1. Обмежений доступ, захисний одяг та рукавички.

Рівень 2. Практика УББЖ-1 плюс знаки біологічної безпеки. БББ класу I або II при роботі, яка передбачає утворення аерозолів. Деконтамінація відходів та кліток перед прибиранням.

Рівень 3. Практика УББЖ-2 плюс регульований доступ. БББ та спеціальний захисний одяг при виконанні будь-якої роботи.

Рівень 4. Практика УББЖ-3 плюс строго обмежений доступ. Заміна одягу перед входом. БББ класу III або спецодяг з надлишковим тиском. Душ на виході. Деконтамінація всіх відходів перед їх видаленням з лабораторії.

ТЕМА: ТЕСТ ЕЙМСА: ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою проведення теста Еймса, здійснити оцінку мутагенного потенціалу хімічних сполук.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Тест Еймса (англ. Ames test) – це біологічний аналіз, розроблений Брюсом Еймсом, який використовується для оцінки мутагенного потенціалу хімічних сполук шляхом спостереження за їх здатністю індукувати мутації в конкретних штаммах бактерій, насамперед *Salmonella typhimurium*.

Є біологічним тестом, призначеним для оцінки мутагенного потенціалу різних хімічних речовин, ліків або пристроїв для імплантації. Цей тест спеціально оцінює здатність цих речовин викликати мутації в ДНК тесту організму, переважно з використанням гістидинових ауксотрофів *Salmonella typhimurium* або триптофан ауксотрофів *Escherichia coli*.

Принцип тесту Еймса полягає у використанні специфічних штамів бактерій, насамперед гістидинових ауксотрофів *Salmonella typhimurium*, які не здатні синтезувати незамінну амінокислоту гістидин через мутацію. Коли ці бактерії піддаються дії середовища, у якому немає гістидину, вони не можуть рости. Однак, якщо досліджувана хімічна речовина викликає зворотну мутацію (реверсію), яка дозволяє бактеріям відновити свою здатність виробляти гістидин, вони можуть рости та утворювати колонії на середовищі з дефіцитом гістидину.

Тест служить в якості швидкого і зручного аналізу для оцінки потенціалу канцерогенності з'єднання, оскільки стандартні канцерогенні аналізи на мишах і щурах забирають багато часу (від двох до трьох років) і дорого коштують. Проте, отримання помилкових результатів також зустрічається.

У тесті Еймса передбачуваний мутаген вводиться в середовище. Якщо швидкість реверсії, про яку свідчить поява більшої кількості колоній, збільшується в присутності ймовірного мутагену, це вказує на мутагенний потенціал хімічної речовини. Чим більше утворюється колоній, тим вище мутагенність досліджуваної речовини.

Крім того, тест Еймса також можна провести з використанням ауксотрофів триптофану *Escherichia coli*. У цьому варіанті в середовищі відсутня амінокислота триптофан. Принцип залишається незмінним: якщо бактерії повертаються до стану, коли вони можуть синтезувати триптофан (через дію мутагену), вони будуть рости на середовищі з дефіцитом триптофану.

Ауксотрофними називаються мутантні клітини, які не здатні рости на мінімальному поживному середовищі без додавання метаболіту, біосинтез якого порушений в результаті мутацій.

У контексті тесту Еймса мутантні штами *Salmonella* не можуть рости або утворювати колонії на середовищі, у якому відсутній гістидин, через специфічну

мутацію, яка пригнічує біосинтез гістидину. Однак під впливом мутагенних хімікатів ці речовини можуть скасувати мутацію в бактеріальних клітинах, дозволяючи їм рости на середовищі з дефіцитом гістидину. Ця зміна вказує на **мутагенну природу хімічної речовини**.

Матеріали та реагенти, необхідні для теста Еймса:

- Стерильні чашки Петрі діаметром 90 мм і глибиною 15 мм.
- Наконечники доступні в різних об'ємах: 1,000 мкл, 200 мкл і 10 мкл.
- Колби та склянки Ерленмейєра об'ємом 10 мл, 250 мл та 500 мл.
- Пробірки Eppendorf ємкістю 1.5 мл та 2.0 мл.
- Петлетримач металевий, а саме металева петля Ч-2.
- Г-подібний розподільник, необхідний для рівномірного розподілу бактеріальних культур на чашках з агаром.

Методика була описана в ряді робіт на початку 1970-х Брюсом Еймсом і його групою в Каліфорнійському Університеті, Берклі.

У тесті використовуються деякі штами бактерії *Salmonella typhimurium*, які несуть мутації в генах, що беруть участь в синтезі гістидину (тобто це ауксотрофні мутанти, що потребують штучного внесення гістидину для зростання).

У тесті вивчається можливість передбачуваного мутагену викликати реверсивну мутацію даного гену, при якій штам набуває здатності рости на середовищі, що не містить гістидину. Призначені для тестування штами підібрані таким чином, щоб вони містили обидві рамки зчитування (наприклад, штами TA98, TA-1537 і TA-1538) і точкові мутації (наприклад, штами TA100, TA1535, TA-1531) в генах відповідальних за синтез гістидину, що дозволяє виявляти мутагени шляхом впливу на різні механізми. Деякі хімічні сполуки вкрай специфічні і тому викликають реверсії тільки в одному або двох штаммах.

Мутагени – це речовини, які викликають мутації. Для тесту Еймса специфічні мутагени використовуються як контрольні для підтвердження чутливості тесту. Вони включають:

- Азид натрію;
- 4-Нітрохінолін N-оксид;
- 2-амінофлуорен;
- Бензо(а)пірен;
- Мітоміцин С;
- 2,4,7-тринітро-9-флуоренон;
- 4-нітро-о-фенілендіамін.

Використовувані в тесті штами також несуть мутації в генах, відповідальних за синтез ліпополісахариду, роблячи клітинні стінки бактерій більш проникними. Крім того, відсутність деяких генів, відповідальних за репараційні процеси, робить тест більш чутливим.

З огляду на корінні відмінності між метаболізмом бактерій і ссавців в тесті може бути використана витяжка з печінки щурів для імітації ефекту обміну речовин, так як деякі сполуки, наприклад бензапірени, не володіють мутагенною активністю, але їх похідні, які утворюються в процесі метаболізму, набувають генотоксичності (рис. 2).

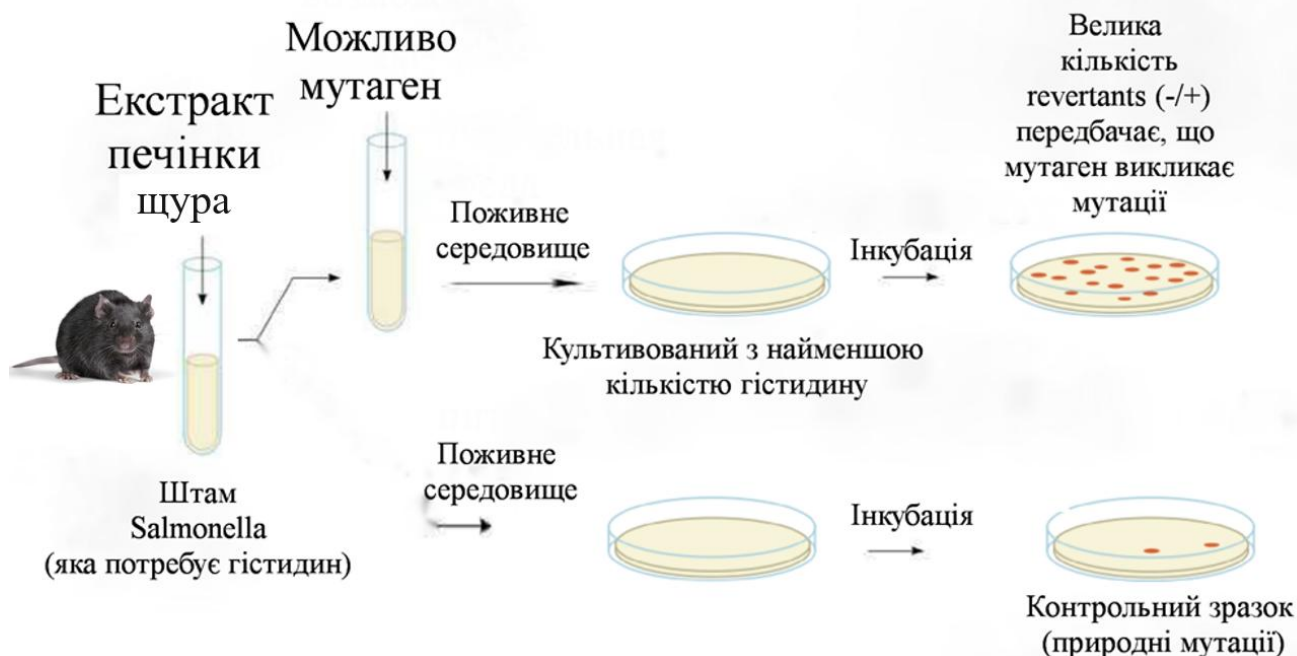


Рис.2. Схема проведення тесту Еймса

ПРОЦЕДУРА ТЕСТУ ЕЙМСА

1. **Створення нових колоній:** почніть зі створення нових колоній для кожного штаму *S. typhimurium*. Ці штами слід інкубувати протягом ночі в живильному бульйоні Oxoid №2 при температурі 37°C. Переконайтеся, що вони поміщені на шейкер, встановлений на 120 об/хв для оптимальної аерації.

2. **Приготування базових розчинів:** у день проведення експерименту приготуйте вихідні розчини мутагенів позитивного контролю. Ці розчини будуть відрізнятися залежно від того, містять пробірки S9 чи ні.

3. **Маркування та підготовка пробірки:** належним чином позначте пробірки Falcon на 10 мл для кожного штаму, посилаючись на таблицю 2 для необхідних

умов. Одночасно підготуйте мінімальні чашки з глюкозою, розподіливши 20 мл на кожну чашку Петрі розміром 90 мм x 15 мм. Усі таблички повинні мати відповідне маркування.

4. Приготування розчину агару: приготуйте нагрітий розчин агару та підтримуйте його температуру близько 45°C за допомогою водяної бані. Згодом додайте 5 мл цього нагрітого агару в кожну з пробірок Falcon об'ємом 10 мл.

5. Додавання компонентів: у кожну пробірку з нагрітим агаром додайте послідовно такі компоненти:

- 100 мкл культивованого штаму з кроку 1.
- 200 мкл 0.5 мМ розчину гістидину/біотину.
- Або 500 мкл суміші S9, або 500 мкл натрій-фосфатного буфера, залежно від вимог.

• 100 мкл зразка, який може бути позитивним контролем, негативним контролем або тестовим зразком.

- 100 мкл dH₂O.

6. Змішування та розподіл: швидко перемішайте кожну з пробірок об'ємом 10 мл, щоб отримати однорідну суміш. Потім рівномірно розподіліть цю суміш по пластинах з мінімальною кількістю глюкози. Дайте суміші охолонути і застигнути приблизно 2-3 хвилини.

7. Захист та інкубація: закрийте пластини алюмінієвою фольгою, щоб захистити їх від впливу світла. Потім інкубуйте ці планшети при 37°C протягом 48 годин.

8. Спостереження: після інкубаційного періоду перевірте чашки на наявність колоній. В ідеалі колонії повинні бути рівномірно розподілені по пластині.

ВИКОРИСТАННЯ ТЕСТУ ЕЙМСА

1. Скринінг хімічних мутагенів: основним застосуванням тесту Еймса є скринінг та ідентифікація хімічних мутагенів, які потенційно можуть викликати мутації. Ці мутації можуть бути канцерогенними, створюючи ризик як для людей, так і для тварин. Наприклад, деякі хімічні речовини, такі як харчова добавка АФ-2 і ароматизатор сафрол, були визначені як мутагенні та канцерогенні.

2. Ідентифікація мутагенності препарату: деякі препарати, як-от ізоніазид, який використовується для лікування туберкульозу, виявилися мутагенними. Таким чином, тест Еймса відіграє вирішальну роль у фармацевтичній промисловості, гарантуючи, що ліки безпечні для споживання.

3. Адаптація до еукаріотичних клітин: хоча тест Еймса в основному використовує бактерію *Salmonella typhimurium*, він був адаптований для тестування мутагенів за допомогою еукаріотична клітина культур, дріжджі клітини і навіть моделі тварин. Ця адаптація є важливою, оскільки сальмонела не завжди може бути найкращим організмом для тестування мутагенів людини. Деякі хімічні речовини, наприклад нітрат натрію (NaNO_3), за своєю суттю не є мутагенними, але можуть перетворюватися на мутагени під час метаболізму в організмі. Наприклад, нітрат натрію стає сильним мутагеном, закисом азоту (HNO_2), під впливом HCL у шлунку.

4. Висока чутливість виявлення: тест Еймса дуже чутливий і може виявити відповідні мутанти навіть у величезній популяції бактерій. Ця чутливість гарантує ідентифікацію навіть незначних кількостей мутагенів, забезпечуючи комплексну оцінку безпеки.

5. Акцент на мутагенності над канцерогенністю: важливо зазначити, що тест Еймса в першу чергу перевіряє мутагенність, а не канцерогенність. Однак значний зв'язок існує, оскільки понад 90% мутагенів, виявлених тестом Еймса, викликають рак.

6. Тест на зворотні мутації бактерій: тест Еймса працює за принципом зворотної мутації бактерій. Це означає, що дефектний ген у бактерії може бути мутований назад у функціональний ген, що дозволяє ідентифікувати мутагенні речовини.

7. Екологічний скринінг: тест Еймса є безцінним у виявленні та перевірці потенційно небезпечних хімічних речовин, присутніх у навколишньому середовищі, продуктах харчування чи ліках. Це гарантує ідентифікацію та контроль шкідливих речовин, захищаючи здоров'я населення.

8. Застосування у фармацевтичній промисловості: фармацевтична промисловість значною мірою покладається на тест Еймса. Перед початком клінічних випробувань різні ліки та хімічні речовини перевіряються за допомогою тесту Еймса, щоб переконатися в їх безпеці та відсутності мутагенності.

НЕДОЛІКИ

• **Обмеження модельного організму:** основним організмом, який використовується в тесті Еймса, є *Salmonella typhimurium*, прокаріот. Тому це не ідеальна модель для людей, які є еукаріотичними організмами. Ця різниця в біологічній складності може призвести до розбіжностей у результатах тесту при екстраполяції на стан людини.

• **Метаболічні відмінності:** для імітації метаболічних умов у ссавців тест Еймса використовує фракцію S9 печінки щурів. Ця фракція використовується для оцінки

мутагенного потенціалу метаболітів, що утворюються в системі печінки. Однак між метаболізмом людини та щура існують невід'ємні відмінності, які можуть впливати на мутагенність речовин, що тестуються. Хоча використання фракції S9 печінки людини може підвищити точність тесту, раніше це було обмежено його доступністю. Однак завдяки комерційній доступності його використання може стати більш поширеним.

- **Еукаріотичні адаптації:** враховуючи обмеження використання прокаріотичної моделі, було адаптовано тест Еймса для еукаріотичних клітин, таких як дріжджі. Хоча це пропонує більш складну біологічну модель, вона все ще не повністю повторює людські клітинні умови.

- **Мутагенність проти канцерогенності:** суттєвим обмеженням тесту Еймса є те, що він перш за все визначає мутагени, а не обов'язково канцерогени. Той факт, що речовина є мутагенною, не означає, що вона може викликати рак. Таким чином, будь-який потенційний канцероген, виявлений у тесті Еймса, вимагає подальшого тестування для підтвердження його канцерогенного потенціалу.

- **Хибні позитиви:** деякі сполуки, особливо ті, що містять нітратну частину, можуть давати хибнопозитивні результати тесту Еймса. Наприклад, нітратні сполуки можуть генерувати оксид азоту, найважливіший сигнал молекули, що призводить до помилкових спрацьовувань. Прикладом цього є нітрогліцерин, який дає позитивний результат тесту Еймса, але все ще використовується в медичних цілях сьогодні.

- **Нітратні ускладнення:** хоча деякі нітрати в ліках можуть бути безпечними, нітрати в їжі можуть бути зменшені під впливом бактерій до нітритів. Ці нітрити можуть генерувати канцерогени, реагуючи з амінами та амідами, що ускладнює інтерпретацію результатів тесту Еймса.

- **Необхідність подальшого тестування:** позитивний результат тесту Еймса не вказує остаточно на безпеку або небезпеку речовини. Довгі дослідження токсикології та результатів є важливими для сполук, які дають позитивні результати тесту Еймса, щоб визначити їх фактичний вплив на здоров'я людини.

МІРКУВАННЯ БЕЗПЕКИ

- **Інструкції з біобезпеки:** під час роботи зі *S. typhimurium* важливо завжди дотримуватися стандартних інструкцій з біобезпеки. Це включає використання заглушених піпеток для запобігання випадковим розливам і забезпечення належних методів стерилізації, таких як використання 70% етанолу та автоклавування всіх матеріалів, які контактують з бактерією.

• **Використання кабінету біобезпеки:** усі роботи з хімікатами та штамами слід проводити в камері біозахисту. Цей закритий робочий простір забезпечує контрольоване середовище, яке мінімізує ризик зараження. Перед і після кожного використання шафа повинна бути ретельно стерилізована 70% етанолом. Крім того, він повинен бути підданий ультрафіолетовому світлу протягом принаймні 15 хвилин, щоб забезпечити усунення будь-яких залишкових патогенів.

• **Засоби індивідуального захисту (ЗІЗ):** Щоб захистити себе від можливого хімічного впливу та бактеріального зараження, важливо носити відповідне індивідуальне захисне спорядження. Це включає в себе носіння лабораторних халатів, захисних окулярів і рукавичок. Ці предмети не тільки захищають людину від прямого контакту з небезпечними матеріалами, але й запобігають поширенню забруднюючих речовин в інші області.

• **Правильна утилізація:** Після будь-якого експерименту або процедури з участю *S. typhimurium* усі забруднені матеріали, такі як пробірки, піпетки, наконечники піпеток, халати та рукавички, необхідно зібрати для належної утилізації. Перед викиданням ці матеріали слід автоклавувати для забезпечення повної стерилізації. Автоклавування – це обробка паром під високим тиском, яка ефективно знищує всі мікроорганізми, гарантуючи, що хвороботворні мікроорганізми не потрапляють у навколишнє середовище.

• **Уникнення хімічного впливу:** Працюючи з хімікатами, необхідно бути обережним, щоб запобігти будь-якій формі впливу. Це означає, що всі контейнери надійно закриті, коли вони не використовуються, і поведіться з хімікатами з обережністю, щоб уникнути розливів або бризок.

ТЕМА: ALLIUM-ТЕСТ: ОСНОВНІ ПОЛОЖЕННЯ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою проведення Allium-тесту

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Allium-тест – рослинна тест-система для оцінки мутагенного, мітозмодифікованого і токсичного ефектів факторів хімічної та фізичної природи на основі рослини *Alliaceae* - цибуля ріпчаста (сорт Штутгартен).

У Allium-тесті використовуються корінці паростків цибулі *Alliaceae*, який вперше запропонований Шведською королівською академією наук як стандартний

тест-об'єкт.

Allium-тест рекомендований експертами як стандарт в цитогенетичному моніторингу навколишнього середовища, так як результати, отримані під час проведення даного тесту, показують кореляцію з тестами на інших організмах: водоростях, рослинах, комахах, в тому числі на ссавцях та людині. Рекомендований в якості альтернативи генотоксикологічних тестів на лабораторних тваринах (в тому випадку якщо для одних і тих же досліджуваних речовин спостерігається однаковий результат в даному тесті і тестах на тваринах, тобто якщо показана кореляція).

Кореневі клітини містять певні ферменти, які виконують функції оксидаз, які сприяють перетворенню багатьох не мутагенних речовин в мутагенні. Ця система активації дозволяє виявити ті хімічні речовини, які посилюють свій токсичний ефект в процесі метаболізму.

Біотест може також використовуватися для вимірювання відносної токсичності нерозчинних у воді сполук, за умови, що вони можуть бути розчинені у відповідному розчиннику, а потім розбавлені у воді таким чином, що залишкова концентрація не перевищить певних меж. У таких випадках для контролю розчинників повинен також бути організований тестовий режим. Біотест діє в широкому діапазоні рН (3,5-11,0) без якихось очевидних ефектів на прирости корневих систем. Тому помірно кислі/лужні зразки води, хімічні розчини можуть бути досліджені без необхідного коригування рН.

Переваги рослинної тест-системи Alliumseae. Даний метод не вимагає знання каріотипу та ідентифікації типів ушкоджень хромосом, є простим, економним, швидким і досить чутливим для визначення мутагенності та цитотоксичності фактору.

Метод дозволяє реєструвати хромосомні мутації типу делецій і транслокацій, наслідком яких є наявність мостів і фрагментів в ана- і телофазі. Метод дозволяє виявляти зміни поведінки хромосом на веретені поділу. Allium-тест ідеально підходить для проведення мікроядерного тесту.

Використання цибулі Alliumseae в тестах. Цибуля має 16 хромосом ($2n = 16$), які добре зафарбовуються. Тривалість клітинного циклу становить приблизно 17,8 години. Мітотичний індекс може коливатися в різних коренях однієї і тієї ж рослини, але всередньому дані є досить стійкими. Тривалість мітозу в різних тканинах кореня Alliumseae однакова і не змінюється по довжині кореня. Співвідношення різних фаз мітозу не залежить від часу фіксації.

Тести з використанням меристематичних тканин проростків корінців цибулі

дозволяють реєструвати токсичні (приріст корінців), мітозмодифіковані (порушення мітотичної активності меристеми, патологія веретена поділу) і мутагенні ефекти (індукції мікроядер і хромосомні мутації).

Точки контролю клітинного циклу (checkpoints) являють собою періоди циклу, де відбувається перевірка точності виконання попередньої стадії. Такий механізм оберігає клітини, які діляться від летального мітозу, зупиняючи розподіл і даючи час системі репарації для відновлення пошкоджень ДНК. Коли контролюючий механізм виявляє пошкоджену або не реплікаційну ДНК відбувається затримка в клітинному циклі, протягом якого відбувається коригування. Точками контролю є переходи G1-S і G2-M. Існує також особлива точка контролю при переході від метафази в анафазу. Збільшення кількості порушень при впливі генотоксикантів призводить до затримки клітинного циклу в точках контролю, що відбивається на кількості клітин, які діляться і на тривалості фаз клітинного циклу.

Як наслідок, для зменшення можливих помилково негативних відповідей при виявленні генотоксичних і канцерогенних факторів зручно використовувати такий показник як мітозмодифікована активність досліджуваного фактору, яка визначається за рівнем мітотичної активності тканини і відносної тривалості фаз мітозу. Дослідження мітозмодифікованої активності дозволяє виявити ранні зміни цитогенетичної системи організму, викликані комплексом різних порушень.

Мітозмодифікований ефект в меристемі кореня рослин досліджується паралельно з визначенням частоти хромосомних аберацій. Отже, в одному тесті можна зареєструвати широкий спектр порушень генетичних структур і генетичних процесів, що спрощує дослідження і зменшує витрати на його проведення.

Таким чином використання рослинної тест-системи дозволяє не тільки сказати про кількісний вплив досліджуваного фактору на живий об'єкт, але і визначити характер впливу по ураженим ділянкам генетичного матеріалу.

Методика проведення тестування

Хімічні реактиви, які використовуються для досліду, наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Хімічні реактиви

Речовина	Методика приготування
Ацетоорсеїн 2%	2 г орсеїну розчиняють в 100 мл гарячої 45%-ої оцтової кислоти, доводять до темного кипіння (кипіння не припустимо) і фільтрують. Використовується для забарвлення

	корінців.
Фіксатор Кларка	суміш 96% етилового спирту і крижаної оцтової кислоти в співвідношенні 3:1. Використовується для фіксації корінців.
Спирт 70%	суміш 96% етилового спирту і дистильованої води. Використовується для довготривалого зберігання корінців.
Оцтова кислота 40-45%	суміш крижаної оцтової кислоти і дистильованої води. Використовується для приготування препаратів.

Підготовка матеріалу: виберіть цибулини для дослідження. Вибірка повинна бути однорідною як в контрольному, так і в дослідному варіантах досліду. Середня маса посіву – 10-20 г, діаметром 1,5-2 см.

Вибрані цибулини не повинні бути пересушені. Це можна зрозуміти, знявши зайве лушпиння, яке до того ж може заважати проведенню досвіду. До початку експерименту у цибулин не повинно бути зелених паростків листя, які проклюнулися.

Підготовка фактору мутагенезу і процедура тестування. Існує два варіанти Allium-тесту: оригінальний і модифікований. В оригінальному варіанті тесту цибулини поміщають для пророщування корінців в чисту воду (прим: автор допускає використання водопровідної води. Слід взяти до уваги той факт, що в Швеції, звідки родом автор, водопровідна вода дійсно дуже чиста. Як варіант, можна використовувати очищену питну воду низької мінералізації). Після досягнення корінцями 1-2 см цибулини переносять в ємності з досліджуваним розчином на певний час (від 2 годин, у разі з розчином колхіцину – до 3 днів). Оригінальний варіант найбільш зручний при тестуванні фізичних факторів.

У модифікованому варіанті тесту цибулини поміщають безпосередньо в досліджуваний розчин без попереднього пророщування корінців. Даний варіант частіше використовується при тестуванні хімічних речовин.

Для чистоти експерименту допустимо використання дистильованої води. При цьому цибулина буде рости за рахунок внутрішніх поживних резервів протягом усього експерименту, не відчуваючи пригніченості. В експериментах, де досліджуються хімічно активні речовини, переважно використовують дистильовану

воду, щоб уникнути утворення інших сполук. Обмеження тут в тому, що дистильована вода є фізіологічно неповноцінною і в цілому ряді інших тестів її використовувати важко. Однак і в контролі, і в досліді в цьому випадку збиток від дистильованої води вважатимемо рівним, як і інші фонові умови.

Цибулини пророщують від 3 до 4 днів. Бажано використовувати ємності діаметром 1,5 см і заввишки 10 см, щоб у міру зростання коріння не впиралися в дно ємності, в якій вони знаходяться. Інакше це може призводити до деяких біологічних ефектів – реакція меристеми на перешкоду. Для проведення ана-телофазного аналізу беруть частину корінця довжиною близько 1 см. Проводять процедуру фіксації (для довготривалого зберігання). При необхідності корінці відмивають від фіксатора у воді, потім фарбують ацеторсеїном згідно зі стандартною методикою. Для мікроскопування використовують кінчик кореня завдовжки 1-2 мм – зона активного ділення меристематичних клітин.

Обробка матеріалу після проведення експерименту

Для **фіксації** корінці поміщають в ємності з фіксатором Кларка. Ємності герметично закривають і залишають для фіксації клітин на 1-2 дні. Потім матеріал промивають два рази від фіксатора в 70% спирті, і поміщають в ємності з 70% спиртом для довготривалого зберігання. Спирт повинен перевершувати матеріал за обсягом в 4-5 разів.

Забарвлення корінців виробляють 2% ацеторсеїном. Коріння відмивають від спирту у воді (зручно в чашках Петрі). Матеріал переносять в невеликі порцелянові тиглі з тримачем, які на 2/3 заповнюють барвником. Тигель накривають предметним склом. Нагрівають над полум'ям спиртів до таємного кипіння (запотівання покривного скла). Тигель з матеріалом залишають на деякий час для зафарбовування хромосом (від 2 годин до 1 доби). Після цього можна готувати препарати для мікроскопування.

Методика приготування препаратів для мікроскопічного аналізу. Готують тимчасові роздавлені препарати кореневих меристем. Для цього від пофарбованого корінця лезом відрізують кінчик меристеми довгою 2-3 мм (кінчик відрізняється по більш темному забарвленні і потовщенням), поміщають на предметне скло в краплю 45% оцтової кислоти, накривають покривним склом і за допомогою сірника акуратно розчавлюють до отримання моношару клітин. Препарати аналізують під мікроскопом при збільшенні $12,5 \times 1,5 \times 40$. На препаратах розглядають дрібні, округло-квадратної форми клітини з добре профарбованими ядрами і неушкодженими клітинними стінками.

Скринінг-тест

Перед генетичним аналізом слід провести первинний скринінг-тест, який відразу покаже чи володіє фактор вираженою біологічною активністю. Основним і найбільш важливим досліджуваним макропараметром є ріст коренів. Але крім нього можуть ще вивчатися інші параметри:

- **Тургесценція.** Твердість кінчиків коренів пов'язана зі ступенем токсичності фактору. При високій токсичності фактору тургесценція падає, що може привести до загибелі коренів.

- **Зміна кольору.** Протягом експерименту може змінюватися колір корінців і причина тому - вміст у воді певних солей (наприклад, синьо-зелений від мідного купопросу). Крім того кінчики коренів можуть стати коричневими, що пов'язано з токсичним ефектом фактору, що викликає клітинну смерть.

В якості стандартних досліджуються такі параметри:

1. Форма коренів. Розбухання кінчиків коренів після 4-5 днів впливу свідчить про особливий тип порушення с-мітозі. Вигин коренів або їх кінчиків відбувається, як правило, після впливу розчинів певних солей.

2. Довжина коренів – це значення середньої довжини коренів (для 1 цибулини).

Методика вимірювання довжини коренів. Виміряти довжину коренів можна двома способами:

1. Зазвичай довжина кореневої системи вимірюється зовні ємності за допомогою рулетки (вимір для кожної цибулини). При цьому реєструється максимально досягнута довжина коренів (не враховуючи більш короткі коріння) для кожної цибулини. Потім обчислюється середнє по всій вибірці цибулин (від 3 до 5 штук) у варіанті досліду. Цей метод дозволяє проводити вимірювання протягом експерименту.

2. Більш точним є другий спосіб. Після закінчення експерименту коріння зрізаються у цибулини під основу, вимірюється довжина кожного корінця, обчислюється середнє значення (середнє значення для кожної цибулини). Пошкоджені коріння не враховуються. Потім встановлюється середнє значення довжини коренів для всієї вибірки цибулин.

Обчислення параметра кореневого приросту можна здійснити двома способами:

1. Розраховується середня довжина коренів для кожної цибулини в дослідних і контрольних групах. Потім обчислюється загальне середнє значення довжини для

дослідної та контрольної груп. Обчислюється у скільки разів довжина коренів у дослідній групі більше / менше ніж у контрольній і виражається у відсотках. Статистичну обробку результатів проводять з використанням дисперсійного аналізу і / або критерію Стьюдента.

Можна обчислювати середнє значення відразу в цілому по кожному варіанту експерименту (тобто не обчислюючи середнього значення для конкретної цибулини, оскільки вся група цибулин перебувала в однорідних умовах). Для порівняння сумарних вибірок з дослідної та контрольної груп можна використовувати дисперсійний аналіз і критерій Стьюдента.

Зміна довжини коренів в Allium-тесті є показником токсичності. Це дуже чутливий показник, який легко реєструється візуально і не вимагає ніяких спеціальних реактивів і апаратури, добре корелює з мікроскопічними параметрами і тому запропонований як короткострокового скринінг-тест. Якщо відбувається значне пригнічення росту коренів у порівнянні з контролем, то відзначають токсичний ефект фактору. У разі значного приросту коренів, говорять про стимулюючий ефект.

Мікроскопічні дослідження і статистична обробка

Розрахунок частоти мутацій. У Allium-тесті для розрахунку частоти мутацій традиційно застосовується метод анателофазного аналізу частоти хромосомних аберацій.

На стадії анателофази реєструються мутації, пов'язані з грубим порушенням структури хромосом, а також з пошкодженням мітотичного веретена (веретена поділу) або зміною поведінки хромосом на веретені поділу: відставання хромосом, аберантні мітози (триполюсні мітози, чотирьохполюсні мітози, асиметричні мітози).

При оцінці мутагенної активності хімічних речовин досить використовувати лише анателофазний аналіз, тобто реєструвати мутації в фазах мітозу, так як меристеми протягом всього дослідження знаходяться в контакті з чинником, який на них впливає. У проміжках між опроміненнями відбувається перетворення індукованих в анафазі і телофазі хромосомних фрагментів - клітини виходять з мітозу і переходять в інтерфазу, а фрагменти стають мікроядрами. В результаті ці мутації залишаються неврахованими. У зв'язку з цим була запропонована модифікація методу Allium-тесту, яка дозволяє враховувати всю суму мутацій.

На одному препараті було рекомендовано застосовувати ана-телофазний аналіз і мікроядерний тест. При цьому аналізується вся сукупність клітин (діляться і не діляться), що дозволяє уникнути помилково негативних результатів і отримати

більш достовірні результати.

Розрахунок мітотичних індексів (табл. 2) можна проводити на тих же препаратах, що і анателофазний аналіз. Проглядається від 400 до 600 клітин (більше-краще). Підраховується загальна кількість клітин, які діляться і окремо клітини на різних стадіях мітозу.

Таблиця 2

Мітотичні індекси

Позначення фази/індексу	Характеристика	Розрахунок індексу
MI	мітотичний індекс – відсоток клітин, що діляться від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$MI = \frac{P+M+A+T}{N} * 100\%$, де $(P+M+A+T)$ – сума клітин, які знаходяться на стадії профазу, метафазу, ана- і телофазу, N – загальна кількість проаналізованих клітин
Pi	профазний індекс – відсоток клітин в профазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$Pi = \frac{P}{P+M+A+T} * 100\%$, де $(P+M+A+T)$ – сума клітин, які знаходяться на стадії профазу, метафазу, ана- і телофазу, P – кількість профаз у порохованих клітинах
Mi	метафазний індекс – відсоток клітин в метафазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$Mi = \frac{M}{P+M+A+T} * 100\%$, де $(P+M+A+T)$ – сума клітин, які знаходяться на стадії профазу, метафазу, ана- і телофазу, M – кількість метафаз у порохованих клітинах
Ai	анафазний індекс - відсоток клітин в анафазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$Ai = \frac{A}{P+M+A+T} * 100\%$, де $(P+M+A+T)$ – сума клітин, які знаходяться на стадії профазу, метафазу, ана- і телофазу, A – кількість анафаз у порохованих клітинах
Ti	телофазний індекс - відсоток клітин в телофазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$Ti = \frac{T}{P+M+A+T} * 100\%$, де $(P+M+A+T)$ – сума клітин, які знаходяться на стадії профазу, метафазу, ана- і телофазу, T – кількість телофаз у порохованих клітинах
A-Ti	ана-телофазний індекс - відсоток клітин в анафазі і телофазі мітозу від загальної кількості проаналізованих клітин, %.	$A-Ti = \frac{A+T}{P+M+A+T} * 100\%$, де $(P+M+A+T)$ – сума клітин, які знаходяться на стадії профазу, метафазу, ана- і телофазу, $A+T$ – кількість ана- і телофаз у порохованих клітинах

ТЕМА: БІОЛОГІЧНЕ ОЧИЩЕННЯ СТІЧНИХ ВОД ЗА ДОПОМОГОЮ АКТИВНОГО МУЛУ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою очищення стічних вод за допомогою активного мулу.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Активний мул – метод біологічного очищення стічних вод, в основі якого лежить біотичний колообіг речовин, що включає процеси утилізації, трансформації та мінералізації органічних речовин за допомогою реалізації процесу аеробної ферментації органічних стоків специфічним комплексом мікроорганізмів з бактерій, черв'яків, грибів, водоростей, найпростіших, коловерток, нематод, кліщів та ін.

Вид біологічного очищення методом активного мулу є екологічно чистим та економічно найбільш раціональним заходом. Більше 90% стічних вод очищається саме цим методом. Біологічна очистка стічних вод, яка застосовується на очисних спорудах каналізації, складає блок біологічної очистки з аеротенків і вторинних відстійників і застосовується після механічної очистки стічних вод в блоках механічної очистки.

Аеротанк (аеротенк) – споруда для штучного біологічного очищення стічних вод за допомогою активного мулу (бактерії-мінералізатори та інші нижчі організми) і продування повітрям (аерації).

Біотехнологія очищення стічних вод активним мулом була запропонована і реалізована в Англії у 1914 р. і відтоді принципово не змінилася.

Біологічне очищення стічних вод здійснюється за рахунок спроможності мікроорганізмів використати для свого живлення органічні речовини необхідні для їхньої життєдіяльності – азот, фосфор, калій з різноманітних сполучень, що містяться в стічних водах.

В процесі живлення мікроорганізми одержують матеріал для побудови свого тіла, внаслідок чого відбувається приріст маси активного мулу.

Активний мул являє собою складну екосистему, до складу якої входить велика кількість представників мікрофлори і мікрофауни: нитчасті бактерії, гіфи водних грибів, дріжджі, джгутикові, саркодієві, інфузорії, коло-вертки, водні черви та в невеликих кількостях інші багатоклітинні безхребетні (водяні кліщі, гастротрихт тощо). Активний мул на 95 і більше відсотків складається з прокариотів, здебільшого бактерій, і тільки менше 5% біомаси мулу становлять найпростіші.

Основу цієї системи як у кількісному співвідношенні, так і за значимістю в

процесі очищення складають бактерії у вигляді пластівцеподібних скупчень – *Zoogloea*.

Здатність активного мулу утворювати міцні пластівці, що швидко осідають (седиментаційна властивість) – відноситься до його головних технологічних властивостей, і їм належить найважливіша роль у забезпеченні надійності роботи біологічних очисних споруд.

Порушення седиментаційних властивостей активного мулу призводить до так званого «спухання» активного мулу – він починає мати малу щільність, займає великий об'єм, проходить збільшення мулового індексу до значень понад 150 мл/г, внаслідок чого активний мул не встигає повністю відокремитися від очищеної рідини після двогодинного відстоювання у вторинному відстійнику, починає виноситися з вторинних відстійників і вже не втягується в подальший процес очищення води.

Мікроорганізми активного мулу також є біоідентифікаційними методами моніторингу характеру забруднюючих речовин у стічних водах, а також ефективним індикатором виявлення якості активного мулу.

Ланки трофічного ланцюга. Більшості організмів активного мулу характерний гетеротрофний тип харчування, що передбачає засвоєння органічної речовини, яка в завислому або розчиненому стані надходить в аеротенк разом зі стоками.

До 70% чисельності та біомаси організмів активного мулу складають гетеротрофні бактерії, хоча вміст цих бактерій в активному мулі, може бути різним, що залежить від умов проведення процесу. Часто, бактерії, завдяки характерному для кожного виду бактерій певному набору ферментів, спеціалізуються на тому чи іншому типі забруднення, що обумовлює їх паралельну роботу над нейтралізацією забруднюючих речовин стоків.

Засвоюють органічні речовини в розчиненому або завислому стані:

- бактерії:
- неспороутворюючі грамнегативні палички: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Achromobacter*;
- водяні гриби родів: *Fusarium*, *Mucor*, *Saccharomyces*;
- джгутикові: *Tetrachymina pyriformis*.

Інфузорії активного мулу, а саме представники наступних родів характеризуються голозойним типом живлення: *Paramecium*, *Colpidium*, *Glaucocoma*, *Sentor*, *Vorticella*, *Carchesium*, *Eoistylis*, *Zoothamnium*, *Opercularia*.

Наступна ланка трофічного ланцюга належить джгутиковим, представникам рівновійкових (роди *Chilodonella*, *Colpoda*, *Trochilla*), спіральновійкових (роди *Aspisisca*, *Oxytricha*, *Opistotricha*), а також деяким багатоклітинним безхребетним (нематоди, малоцетинкові черви, коловертки).

Подальший етап пов'язаний з розвитком хижацтва: інфузорії родів *Euplotes*, *Didinium*, *Tokophria*, *Acineta*; деякі джгутикові: *Vodou edax*, *Peranema trichophorum*); коловертки та малоцетинкові черви.

Типова технологічна схема такого очищення води. Стічна вода, з блоку механічної очистки, після механічного очищення від крупних часток, що осідають чи спливають у полі земного тяжіння, потрапляє в аеротенк – вузьку (3-11 м), глибоку (4-6 м) і довгу (50-250 м) споруду, де за допомогою дрібнобульбашкового аератора нагнітається повітря. В аеротенку, за постійної аерації стічна вода очищається складним гідробіоценозом – **активним мулом**. Обробка триває 6-24 (і навіть більше) годин.

Після обробки вода надходить у вторинний відстійник, в якому звільняється від активного мулу, а потім потрапляє для так званого третинного фізико-хімічного доочищення (іноді після хлорування) у проміжні водойми (ставки) і, нарешті, у річку. Частина активного мулу з сорбованими неокисленими забрудненнями, що осідає у вторинному відстійнику, повертають до біологічної очисної споруди – аеротанку.

За такої технології утворюється надлишковий мул, що створює складну для розв'язання еколого-технологічну проблему: його дуже багато і він містить небезпечні віріони, мікроорганізми, яйця гельмінтів тощо, а також іони важких металів, біологічно стійкі, токсичні і навіть мутагенні сполуки.

Умови проведення процесу залежать від наявності і оптимального співвідношення в стічних водах органічного вуглецю, азоту і фосфору, мікроелементів (сірки, марганцю, заліза, кобальту і ін.), дотримання гранично допустимих концентрацій забруднюючих речовин, відсутності в стічних водах токсичних для мікроорганізмів речовин, достатньої кількості кисню та інтенсивності аерації, температурного режиму, значення рН, навантаження на мул за кількістю забруднюючих речовин, часу контакту мулу і стічних вод, конструктивних і особливостей споруд та біологічної схеми очищення, і ін.

Надлишковий мул збирається та підсушується на мулових майданчиках. Способом утилізації надлишкового мулу, а також стічних вод органічного походження може бути метанова ферментація та біометаногенез з отриман-

ням біогазу.

ТЕМА: МЕТОДИ ОТРИМАННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методами отримання нуклеїнових кислот.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Більшість досліджень в молекулярній біології застосовують **виділені нуклеїнові кислоти** для проведення тих чи інших експериментів. При цьому, **чистота і якість зразків**, наприклад, РНК – вкрай важлива, адже від цього безпосередньо залежить результат дослідження.

Існують різні технології та методи виділення РНК, які можуть відрізнятися за принципом дії і типом біологічного матеріалу.

Здебільшого пробопідготовка до біохімічних і діагностичних досліджень починається з екстракції нуклеїнових кислот. Такі процеси, як, наприклад, *ампліфікація методом ПЛР, секвенування, зворотна транскрипція або синтез ДНК* проводяться тільки на зразках виділеної і очищеної НК. Отримати максимально якісні та чисті зразки нуклеїнової кислоти для аналізу вкрай важливо, адже домішки білків та інших органічних речовин можуть спотворити результат.

Інгібітори (від лат. *inhibeo* – зупиняю, стримую) – біогенні речовини та ксенобіотики (лікарські препарати, отрути тощо), що гальмують каталітичні процеси, які відбуваються за участі ферментів.

Інгібітори, які можуть впливати на чистоту зразка РНК. Погане очищення РНК від речовин, які містилися у вихідному біологічному матеріалі, може стати причиною пригнічення реакції під час проведення аналізу методом ПЛР. Ці речовини можуть вплинути на структуру ферменту і суттєво знизити його активність, або і зовсім деактивувати.

Інгібітори можуть опинитися в розчині РНК з кількох причин:

1. зразки були *погано очищені від органічних речовин в матеріалі*, з якого здійснювалася екстракція. Це можуть бути білки, вуглеводи, залишки жирів та пігментів. Якщо нуклеїнові кислоти виділяли з рослинних клітин, інгібіторами в цьому разі можуть бути, наприклад, хлорофіли, антоціани. Також агентами, що затримують реакцію, можуть бути речовини транспортного середовища – формальдегід або гепарин;

2. зразки були *погано очищені від реагентів*, які використовувалися під час виділення нуклеїнової кислоти. Наприклад, від спиртів, денатурантів, сечовини.

Методи виділення ДНК:

- фенол-хлороформна екстракція;
- виділення на спін-колонках;
- екстракція на магнітних мікроносіях;
- розумна екстракція;
- ферментативна температурно-залежна екстракція.

Метод фенол-хлороформного виділення – цей метод виділення НК широко використовується через свою **відносну дешевизну**. Екстракція за цією технологією відбувається в кілька етапів:

1. отримання лізату. В процесі лізування клітини розщеплюються на фрагменти, які містять частинки клітинної стінки і внутрішньоклітинного вмісту;
2. інактивація нуклеаз;
3. виділення необхідної нуклеїнової кислоти.

Додецилсульфат натрію або **SDS** (від англ. *sodium dodecyl sulfate*) – амфифільна поверхнево-активна речовина, що використовується в широкому спектрі застосувань, включаючи багато домашніх мийних засобів, шампунів, зубних паст, косметики для утворення піни.

У наукових дослідженнях використовується при гелевому електрофорезі для денатурації і нейтралізації заряду білкових молекул.

Екстракція НК за допомогою суміші фенол-хлороформу – найстаріший з відомих методів виділення РНК. Фенол повністю денатурує залишки білків у зразку, але при цьому тільки частково інактивує РНКазу. Щоб вирішити цю проблему, до фенолу і хлороформу додають ізоаміловий спирт в пропорції 25:24:1, а потім змішують з лізатом і поміщають до центрифуги. В результаті виходить двофазний розчин, в якому всі органічні домішки і білки осідають (**гідрофобний шар**), а **РНК – спливає на поверхню** (**гідрофільний шар**). Далі відбирають верхню фазу, яка містить РНК, додають етанол або ізопропанол в пропорції 2:1 або 1:1, щоб осадити РНК з супернатанта.

Як вже відзначили, перевага цього методу в його **відносно невисокій вартості**, оскільки не потрібне додаткове обладнання. Однак, отриманий в результаті зразок нуклеїнової кислоти – **не дуже високої якості**, тому потрібно додаткове очищення.

Ось уже понад 50 років ця технологія залишається однією з найрозповсюдженіших для екстракції НК.

Переваги технології:

- Немає потреби у використанні складного лабораторного обладнання.

- Невисокі фінансові витрати.

Недоліки:

- Процес не автоматизований і має значні витрати часу.
- Отримані НК часто потребують додаткового очищення.
- Можлива втрата зразка.

Фенол-хлороформний метод екстракції ДНК характеризується значно меншим виходом нуклеїнових кислот, якщо порівнювати з іншими сучасними технологіями.

Метод виділення на спін-колонках. В основі методу – властивість нуклеїнових кислот за певних умов *зв'язуватися з силікатами*. Це дає змогу сепарувати компоненти клітини від частинок силіки (діоксиду силіцію) зі зв'язаними нуклеїновими кислотами. Цю властивість НК було відкрито ще в кінці 1970-х, в результаті чого було розроблено технологію екстракції нуклеїнових кислот на силікатних носіях. Екстракція на спін-колонках – сучасніший і вдосконалений метод виділення нуклеїнових кислот.

Конструкція спін-колонки продумана таким чином, що за нанесення на неї клітинного лізату і подальшого центрифугування, *РНК залишається на ній*, а решта фрагментів клітини – *відсівається*. Після цього нуклеїнову кислоту кілька разів промивають, а потім – поміщають в пробірку для забору зразка для дослідження.

Зразок РНК, отриманий в результаті застосування цього методу, *відрізняється чистотою і якістю*. Але, в порівнянні з попереднім описаним методом, *він значно дорожчий*.

Переваги методики:

• Ще простіший спосіб екстракції, якщо порівнювати з фенол-хлороформним виділенням.

- Висока якість і чистота отриманої нуклеїнової кислоти.

Недоліки:

- Іноді екстракція коротких фрагментів ДНК за допомогою силіки ускладнена.
- Безліч маніпуляцій може призвести до забруднення зразка.

Вартість використання спін-колонок вища, ніж попередньої технології. Це пов'язано з тим, що кожна реакція потребує окремої колонки, декількох пробірок і реагентів.

Метод ферментативної температурно-залежної екстракції. Для всіх описаних вище способів виділення нуклеїнової кислоти *лімітувальним чинником є етап лізису*. Для руйнування клітинних стінок у всіх технологіях застосовується додецилсульфат натрію (SDS) і протеїназа К. Справа в тому, що ці речовини –

інгібітори, які можуть уповільнювати полімеразну ланцюгову реакцію. Щоб отримати максимально чистий зразок для дослідження, виділену РНК необхідно кілька разів промити, а це, своєю чергою, підвищує ризик контамінації та може зовсім привести до втрати зразка.

Вирішення цієї проблеми знайшли новозеландські вчені. Щоб мінімізувати вплив хімікатів, що використовуються для екстракції нуклеїнової кислоти, на якість зразка, вони вирішили використовувати *термофільну протеїназу EA1* в поєднанні з *мезофільними гідролазами*.

Переваги:

- Немає втрати нуклеїнової кислоти, тому метод підходить навіть за наявності невеликої кількості біоматеріалу.
- Процес можна автоматизувати.
- Час екстракції – від 7 хвилин (це найшвидший спосіб виділення серед вищевказаних).
- Невисока ціна.

Серед недоліків можна згадати невисокий рівень очищення. Проте зразок придатний для подальшого застосування в секвенуванні, ПЛР та STR.

Метод виділення нуклеїнових кислот на магнітних часточках. На сьогоднішній день завдяки **швидкості виконання і можливості автоматизації процесу** особливою популярністю користується метод виділення НК на магнітних часточках.

Технологія його основана на **зв'язуванні НК з речовиною, яка вкриває магнітні часточки**. В зразок, що лізується, додають магнітні часточки та змішують. Потім фіксують тверду фазу, підносячи пробірки зі зразком до магніту або поставивши їх в магнітний штатив. Потім відбирають супернатант (надосад), а НК промивають та додають розчин для елюції.

Безумовною перевагою цього методу є той факт, що для його проведення **не є обов'язковою наявність складного устаткування**.

Згадані методи виділення РНК – лише незначна частина технологій, застосовуваних сьогодні для екстракції нуклеїнових кислот в процесі пробопідготовки. Крім цього, на ринку є безліч готових рішень, які дозволяють підготувати якісні зразки для аналізу просто «з коробки». У порівнянні з традиційними методами екстракції НК, використання **готових наборів** дає змогу значно скоротити час і трудовитрати на підготовку проб, а також виключити можливі помилки через «людський фактор».

Елюція, елюювання (англ. *elution*, лат. *eluo* (elutum) – вимивати, видаляти) – вилучення речовини з твердого носія в ході хроматографічного розділення шляхом вимивання його відповідним розчинником (елюентом).

Переваги:

- Для роботи не потрібна центрифуга й інше подібне обладнання.
- Органічні розчинники, осадження на колонках і вакуумна фільтрація теж не потрібні.
- Багатоетапне центрифугування відсутнє, тому процес триває менше часу, ніж при інших вищезазначених методах.
- За бажанням процедуру можна автоматизувати.

Недоліки:

- При застосуванні даного способу екстракції ДНК є ймовірність втрати зразка. Ціна магнітної сепарації може бути вищою, ніж використання спін-колонок.

Розумне виділення (smart extraction). Для виділення використовуються спеціальні наконечники з немагнітними часточками, які надягають на дозатор. При заборі клітинного лізату в наконечник нуклеїнова кислота з розчину зв'язується з частинками, потім слідує етапи промивання і елюції, в результаті чого виходить очищена нуклеїнова кислота високої якості.

Ця технологія значно прискорює процес виділення, а завдяки особливостям *«розумної»* поверхні вихід і якість нуклеїнових кислот значно перевершує всі попередні методи.

Даний спосіб екстракції дуже *легко автоматизувати*, адже носики зі зв'язуючими частинками підходять як для звичайних лабораторних дозаторів, так і для різних автоматичних станцій виділення нуклеїнових кислот.

Протокол набув поширення у 2005 році. Для отримання чистої нуклеїнової кислоти беруть наконечники з немагнітними частинками, що мають *«розумну»* поверхню. У ці наконечники здійснюється збір клітинного лізата, під час чого НК з'єднується з немагнітними частинками. Після промивання та елюції виділяється високоякісна нуклеїнова кислота.

Переваги технології:

- Процес екстракції істотно прискорений.
- Дуже висока якість нуклеїнової кислоти.

ТЕМА: МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ РОСЛИН

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою мікроклонального розмноження рослин.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Метод клонального мікророзмноження рослин – одержання в умовах *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідному екземпляру. В його основу покладено унікальну здатність рослинної клітини до реалізації властивої їй тотипотентності, тобто під впливом екзогенних факторів давати початок цілому рослинному організму.

Порівняно із традиційними способами вегетативного розмноження, метод клонального мікророзмноження має ряд переваг:

1. забезпечує одержання генетично однорідного посадкового матеріалу, одержання безвірусних рослин;
2. високий коефіцієнт розмноження (105-106 – для трав'янистих і квіткових рослин, 104-105 – для чагарникових, деревних, 104 – для хвойних);
3. скорочення тривалості селекційного процесу;
4. прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
5. розмноження рослин, які не дають життєздатного насіння;
6. можливість проведення робіт протягом року та економію площ, необхідних для вирощування посадкового матеріалу;
7. автоматизацію процесу вирощування.

Вперше застосування методу клонального мікророзмноження було запропоновано наприкінці 1950-х рр. французьким ученим Ж. Морелем, якому вдалося одержати перші рослини-регенеранти орхідей. Досягненню успіху передувало розроблення техніки культивування апікальної меристеми рослин в умовах *in vitro*.

Процес клонального мікророзмноження можна розділити на чотири етапи (рис. 3):

1. Вибір рослини-донора, ізолювання експлантатів та одержання активно ростучої стерильної культури;
2. Власне мікророзмноження, в результаті чого досягається одержання максимальної кількості мікропагонів;
3. Укорінення розмножених пагонів і наступна їх адаптація до ґрунтових умов, а за необхідності – депонування рослин-регенерантів при знижених температурах (+4 – 2°C, +10°C);

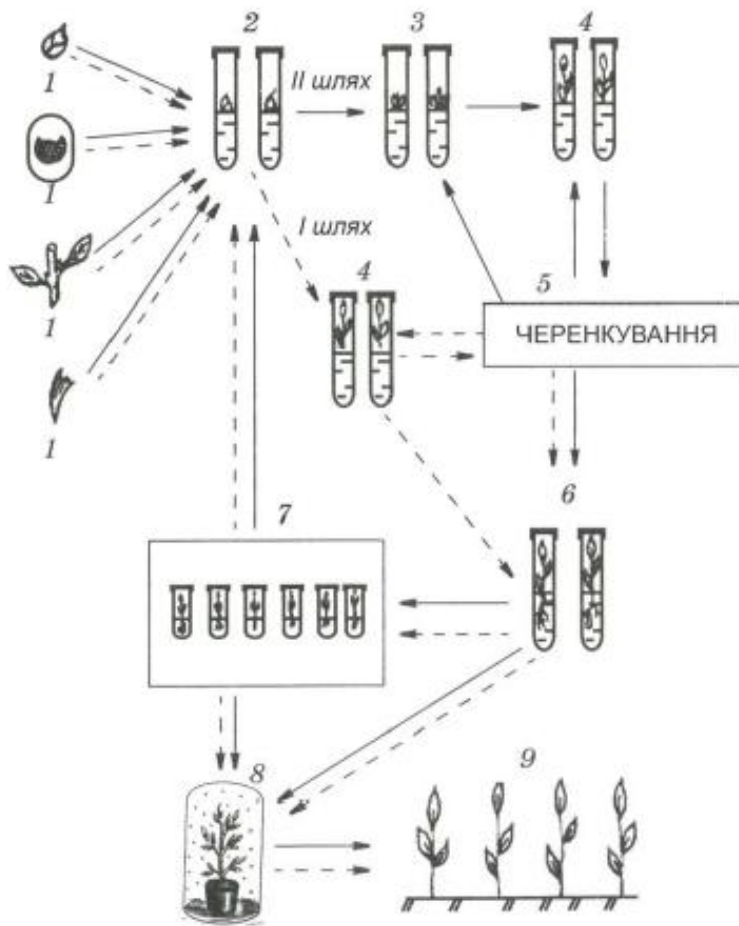


Рис. 3. Схема клонального мікророзмноження рослин методом активування розвитку меристемних тканин (I шлях) та індукція утворення адвентивних бруньок на первинному експлантаті (II шлях): 1 – вибір вихідного експлантату; 2 – одержання стерильної культури; 3 – утворення адвентивних бруньок безпосередньо на первинному експлантаті; 4 – ріст бруньок і формування мікропагонів; 5 – розмноження мікропагонів (мікроживцювання); 6 – укорінення мікропагонів; 7 – депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+2 °С); 8 – переведення рослин у тепличні умови; 9 – висадження рослин-регенерантів у польові умови.

4. Вирощування рослин-регенерантів в умовах теплиці і підготовка їх до реалізації або висадження в польові умови.

Мікроклональне розмноження рослин може бути здійснене наступними методами:

- активуванням розвитку меристемних тканин рослин (апекс стебла, пазушні і

сплячі бруньки та інтеркалярні зони стебла) (рис. 4);

- індукцією виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантату;
- індукцією соматичного ембріогенезу;
- диференціацією адвентивних бруньок у первинної перепасированої калюсної тканини.

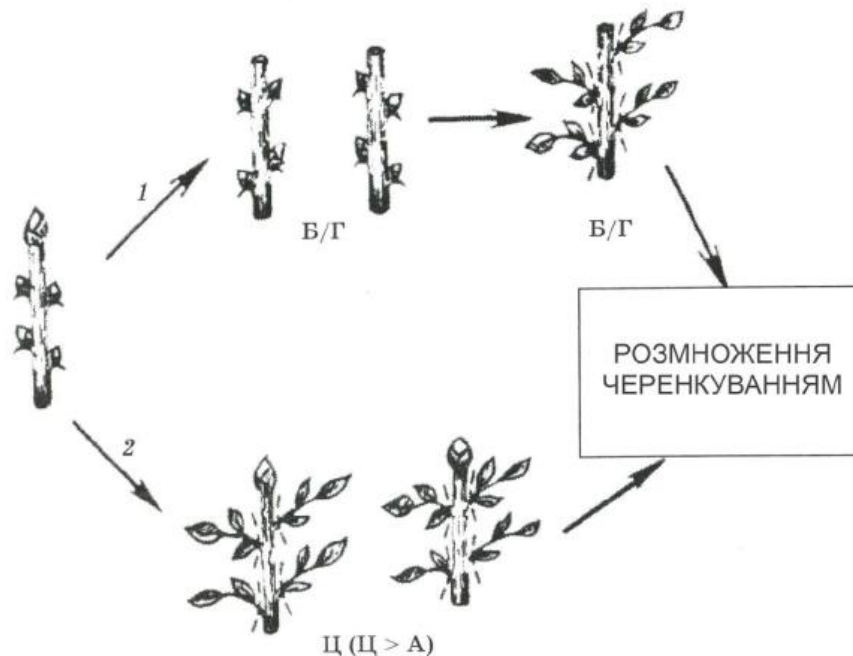


Рис. 4. Схема розмноження рослин методом активування меристемних тканин: 1 – видалення верхівкової меристеми; 2 – додавання в живильне середовище цитокінінів (Б/Г – безгормональне середовище; Ц – цитокініни; А – ауксини).

Серед методів клонального мікророзмноження рослин основним є **метод активування розвитку меристемних тканин рослини**, що базується на інгібуванні апікального домінування досягається двома шляхами:

- видаленням верхівкової меристеми стебла з подальшим мікроживцюванням пагона *in vitro* на безгормональному середовищі;
- додаванням у живильні середовища речовин цитокінінового типу дії, завдяки чому індукується розвиток численних пазушних пагонів.

Як цитокініни зазвичай використовують 6-бензиламінопурин (БАП) або 6-фурфуриламинопурин (кінетин), а також 2-ізопентениладенін і зеатин. Отримані таким способом пагони відокремлюють від первинного материнського експлантату і

культивують на свіжоприготовленому живильному середовищі, стимулюючи проліферацію пазушних меристем і виникнення пагонів більш високих порядків.

Наразі цей метод широко застосовують у виробництві безвірусного посадкового матеріалу різних сільськогосподарських культур – овочевих (томати, картопля, огірок, перець, гарбуз, спаржа та ін.); культур промислового квітникарства (гвоздика, хризантема, троянда, гербера); плодових та ягідних культур (яблуня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, агрус та ін.); деревних порід (тополя, верба, вільха, береза, горобина, секвоя, туя, ялівець та ін.). Для деяких сільськогосподарських культур, зокрема картоплі, технологія клонального мікророзмноження поставлена на промислову основу. Застосування методу активування розвитку меристемних тканин рослин дозволяє одержувати з однієї меристеми картоплі більше 105 рослин на рік. Технологія передбачає також одержання в пробірках мікробульб – цінного безвірусного насінневого матеріалу.

Другий метод – індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантату – заснований на здатності ізольованих частин рослини при сприятливих умовах живильного середовища відновлювати органи і регенерувати цілі рослини. За допомогою цього методу можна досягти регенерації майже будь-яких органів і тканин рослини (ізольованих зародків, листків, стебел, сім'ядоль, лусочок і денця цибулин, сегментів коренів та зачатків суцвіть) за умов одержання безвірусного матеріалу. Цей процес, як правило, відбувається на живильних середовищах, що містять один із цитокінінів або при його поєднанні з речовиною групи ауксинів. Як ауксин у цьому випадку найчастіше використовують (3-індоліл оцтову кислоту (ІОК) або α -нафтилоцтову кислоту (НОК) у співвідношенні 10:1 або 100:1.

Індукція виникнення адвентивних бруньок – один із найбільш поширених методів мікроклонального розмноження вищих рослин. Так, багато цибулинних квіткових рослин (нарциси, лілії, гіацинти, гладіолуси, тюльпани) були розмножені з цибулинних лусочок, сегментів базальної частини денця цибулин, експлантатів листків; представники роду *Brassica* (капуста кольорова, качанна, брюссельська, листовая, брокколі) – із сегментів гіпокотилля, сім'ядоль, листків; цибуля та часник – з верхівкової меристеми, тканини дінця цибулини; томати – з апікальних або пазушних меристем; петунія – із сегментів корінців; глоксинія, фіалки – із сегментів листових пластинок; деякі представники деревних порід – з ізольованих зрілих і незрілих зародків.

Третій метод - одержав назву соматичного ембріогенезу і ґрунтується на

диференціації із соматичних клітин зародкоподібних структур, які за зовнішнім виглядом нагадують зиготичні зародки. Основна відмінність утворення зародків *in vitro* від *in vivo* (у природних умовах) полягає в тому, що соматичні зародки розвиваються асексуально поза зародковим мішком і є біполярними структурами, в яких одночасно спостерігається розвиток апікальних меристем стебла і кореня. Метод використовується для розмноження більшості рослин із родин *Orchidaceae* та *Rutaceae*, деяких представників злакових (пшениця, ячмінь), люцерни, редису, винограду, а також деяких видів деревних порід (осика, евкаліпт, дуб, ялина звичайна).

Четвертий метод клонального мікророзмноження – диференціація адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині. Обмеженою мірою застосовується для одержання посадкового матеріалу *in vitro*, що пов'язано з виникненням небажаних змін при періодичному пересаджуванні калюсних тканин на свіже живильне середовище в разі тривалого культивування. Вони полягають у зміні плідності культивованих клітин, структурних перебудовах хромосом, виникненні генних мутацій, втраті морфогенетичного потенціалу.

Основна перевага клонального мікророзмноження полягає в можливості одержання генетично однорідного, безвірусного посадкового матеріалу. Цього досягають, використовуючи меристематичні тканини апексів і пазушних бруньок органів стеблового походження. Як відомо апікальна меристема складається з конуса наростання, одного або двох листових зачатків (примордіїв) і є вільною від інфекцій.

Фактори, які впливають на процес мікроклонального розмноження. На ефективність мікроклонального розмноження впливають фізіологічні особливості рослини-донора, хімічні та фізичні умови культивування. Найбільш важливими факторами є вибір материнської рослини та експлантату. При *виборі материнської рослини* необхідно враховувати фізіологічні, сортові і видові особливості. Рослини-донори повинні бути здоровими, не уражені грибними, бактеріальними та вірусними хворобами і знаходитись у стані інтенсивного росту (вихід із фази спокою і перехід до активного росту).

При *виборі експлантату* необхідно враховувати його вік, будову і походження. Для забезпечення максимальної стабільності клонованого матеріалу і запобігання появи аномальних рослин, як експлантат використовують молоді, слабо диференційовані тканини. Оскільки, експлантати від ювенільних рослин набагато краще укорінюються, порівняно із зрілими. Особливо це стосується деревних порід.

Тривалість культивування впливає на ефективність клонального мікророзмноження рослин. При тривалому культивуванні протягом декількох пасажів змінюється фізіологічний стан пагонів і зростає частота їх укорінення, а експлантат набуває ознак ювенільності, що впливає на підвищення морфогенетичного потенціалу.

Успіх введення в культуру *in vitro* рослинних тканин часто визначається ефективністю стерилізації і вибором стериліанту, який залежить від особливостей експлантату (ніжних, легко ушкоджуваних рослин і таких тканин, що мають більш щільну оболонку). Дуже часто внутрішнє ураження вихідних експлантатів патогенами буває набагато сильнішим поверхневого, тому їх попередньо обробляють фунгіцидами і антибіотиками для знищення грибних і бактеріальних інфекцій.

Залежно від виду рослин необхідно проводити дослідження для визначення оптимального *складу та консистенції живильних середовищ*. На клональне мікророзмноження впливають регулятори росту, біологічно активні речовини, мінеральні солі, вітаміни і вуглеводи.

До фізичних факторів вирощування відносяться температура і умови освітлення. На перших двох етапах освітленість коливається від 1000 до 3000 лк при фотоперіоді 14-16 годин, відносній вологості повітря – 65-70%, але величини цих параметрів залежать від конкретної культивованої культури. Висока інтенсивність світла може спричинювати хлорози і затримувати розвиток рослин-регенерантів. Однак при перенесенні в ґрунт, у них відмічається краща приживлюваність і більша активність росту.

Температура культивування зазвичай варіює в інтервалі 22-26 °С в денний період доби і 18-22 °С – в нічний. В деяких випадках зниження температури супроводжується підвищенням ефективності розмноження рослин. Для підвищення коефіцієнта розмноження необхідно для рослин кожного виду підбирати індивідуальні умови культивування з урахуванням його природного ареалу.

Адаптація рослин-регенерантів. Пересадження рослин-регенерантів в субстрат – відповідальний етап, який завершує процес клонального мікророзмноження. Найбільш сприятливим періодом для пересадження пробіркових рослин є весна або початок літа. Рослини з двома – трьома листками і добре розвиненою кореневою системою обережно виймають із колб або пробірок пінцетом з довгими кінцями або спеціальним ключком. Корені ретельно відмивають від залишків агару і висаджують в ґрунтовий субстрат, попередньо простерилізований

при +85 °С протягом 1-2 год. Для більшості рослин як субстрат використовують торф, пісок (3:1); торф, дерновий ґрунт, перліт (1:1:1); торф, пісок, перліт (1:1:1). Підготовленим ґрунтовим субстратом заповнюють пікірувальні ящики або торф'яні горщечки, в яких вирощують рослини-регенеранти. Горщечки з рослинами поміщають в теплиці з регульованим температурним режимом (+20-22 °С), освітленістю не більше 5000 лк і вологістю 65-90%. Для кращого росту рослин створюють умови штучного туману.

Через 20-30 днів після посадки, добре укорінені рослини підживлюють розчинами мінеральних солей Кнудсона, Мурасіге і Скуга, Чеснокова, Кнопа (залежно від виду рослин) або комплексним мінеральним добривом. По мірі росту рослин їх періодично пересаджують у більші ємності зі свіжим субстратом. В подальшому акліматизовані рослини вирощують відповідно до прийнятої агротехніки для кожного індивідуального виду рослин.

Процес адаптації пробіркових рослин до ґрунтових умов – найбільш дорога і трудомістка операція. Нерідко після пересаджування рослин в ґрунт спостерігається призупинення їх росту, опадання листків і загибель рослин. Ці явища пов'язані, в першу чергу, з порушеннями діяльності продихового апарату листків пробіркових рослин, внаслідок чого відбувається втрата великої кількості води. По-друге, у деяких рослин в умовах *in vitro* не утворюються кореневі волоски, що призводить до порушення поглинання кореневою системою води і мінеральних солей із ґрунту. Тому доцільно на третьому або четвертому етапах процесу клонального мікророзмноження застосовувати штучну мікоризацію рослин (для мікотрофних), яка відіграє позитивну роль у їх забезпеченні мінеральними і органічними поживними речовинами, водою, біологічно активними речовинами, а також в захисті рослин від патогенів.

ТЕМА: ТРАНСГЕННІ РИБИ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою отримання трансгенних риб.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Трансгенез – це технологія генної інженерії, при якій ізольована послідовність генів одного організму поміщується в інший організм для передачі нової або модифікованої ознаки. Така ізольована послідовність генів

називається «структурою» і складається з функціонального гена і гена промотора, який діє як перемикач для активації функціонального гена.

Організми, отримані в результаті успішного трансгенезу, класифікуються як **генномодифіковані організми (ГМО)**.

Трансгенез був основною темою досліджень в генетиці риб з початку 1990-х років. Дослідження в цій галузі розвинуті більше, ніж в інших видах тваринництва з причини відносної простоти маніпуляцій в репродуктивній біології водних видів.

Індукція трансгенезу повинна включати ряд етапів:

- ідентифікація бажаного цільового гена і розробка структури;
- уведення гена в запліднені яйцеклітини, звичайно з використанням мікроін'єкцій або шляхом застосування електропорації;
- визначення інкорпорації (*приєднання*) трансгена в геном господаря;
- визначення експресії трансгена;
- визначення успадкованого трансгена і квантифікація (*вимірювання якісних ознак у кількісному вираженні*) ефекту трансгена на цільові та нецільові ознаки.

Останній етап зі згаданих тут у край важливий, оскільки він необхідний для повної характеристики властивостей трансгенної риби, щоб оцінити потенційні ризики, пов'язані з її розведенням. Згадані вище фази розвитку були успішно застосовані до кількох видів риб, і були отримані трансгенні лінії з досить високими показниками росту. Зрозуміло, що трансгенез потенційно може приводити до швидких змін в господарсько-цінних ознаках, але для планування та проведення таких досліджень **важливо знати про можливі ризики**.

У 90-х роках минулого століття **Zhiyuan Gong**, професор Сінгапурського національного університету, почав досліди, при яких **в ікринки риб вводилася рідина, що містить гени морського анемона**. Так почалися роботи, які привели до створення акваріумних рибок, що світяться.

Відпрацьовувалася *техніка пересадки в геном риб чужого гена (трансгена) і з'ясовувалося як зробити його конструкцію такою, щоб організм нового господаря почав активно синтезувати чужорідний білок, структура якого закодована у «підсадженому» гені*. Ці дослідження можна було б помітно прискорити, якщо пересаджувати ген, що кодує нетоксичний білок, який легко виявляється, синтез якого можливий вже на самих ранніх стадіях ембріонального розвитку трансгенного організму. І такі гени дійсно були виділені спочатку з медузи (*Aequorea victoria*) – **ген, що кодує зелений флуоресцентний білок (green fluorescent protein, або GFP)**, і трохи пізніше, з морського анемона (*Discosoma sp.*) – **ген, що кодує червоний**

флуоресцентний білок (*red fluorescent protein*, або *RFP*). Ці гени стали широко використовуватися для вдосконалення трансгенних технологій і в ембріологічних дослідженнях.

Виявилося, що **даніо реріо (*Brachydanio rerio*)**, в англійській літературі ***Zebrafish* або *zebra danio* (рибка-зебра)**, якнайкраще підходять для експериментів з *GFP*- і *RFP*-трансгенами. Даніо реріо вкрай невибагливі до умов середовища проживання і до кормів.

Вони не агресивні і можуть жити в дуже невеликих 4-5 літрових ємностях, швидко і легко розмножуються. У даніо виявилася ще одна особливість – **їх ембріони швидко розвиваються і довгий час залишаються майже прозорими**. Та й дорослі риби з ослабленою пігментацією в чималому ступені зберігають цю властивість.

Тому, якщо організм трансгенної риби набуває здатність виробляти флуоресцентний білок, то **світіння легко буде спостерігати навіть у тому випадку, коли експресія вбудованого в її геном гена відбуватиметься в тканинах, розташованих під шкірою і у внутрішніх органах**. Подібні властивості має і японська рисова рыбка – **медака (*Orizias latipes*)**.

Експресія трансгенів контролюється спеціальними послідовностями нуклеотидів у молекулі ДНК, розташованими попереду цих генів – промоторами. Саме від промотора залежить коли і за яких обставин, і в яких тканинах станеться експресія керованого ним гена-репортера. Тому при пересадці генів використовують складну конструкцію найважливішими елементами якої є **промотор** (він може бути рідним для того організму, в геном якого вводять чужорідний ген, а може бути і чужим, узятим від якогонебудь іншого організму), **ген-репортер** (чужорідний для даного організму) і послідовність нуклеотидів, що зупиняють синтез мРНК.

У наведеному вище прикладі для ***GFP*-трансгена** був використаний **промотор гена цитокератину**, який «допускає» експресію цього гена тільки в епідермальних клітинах. У таких випадках кажуть, що промотор тканеспецифічний. Для ***RFP*-трансгена** також використаний тканеспецифічний промотор гена, відповідального за **синтез міозину** (одного з білків м'язів, який забезпечує їх скорочення), тому експресія *RFP*-трансгена і відбувається тільки в м'язовій тканині.

У травні 2001 р. *Dr. Zhiyuan Gong* представив на загальний огляд плоди своїх досліджень: відразу три кольорові форми даніо реріо – червону, помаранчеву і зелену (помаранчева створюється при спільному синтезі *GFP* і *RFP* в м'язовій

тканині у «двічі трансгенних» риб).

Однак **основною метою трансгенних досліджень відносно риб** останнім часом стало **підвищення коефіцієнта росту в аквакультурі за допомогою введення в геном генетичних структур гормону росту**. Дослідження також було спрямовано на інші ознаки, такі як **контроль захворювань та репродукції**, і трансгенні дослідження повинні зосередитися на таких ознаках, які важко поліпшити, застосовуючи кількісні підходи. Трансгенна риба також може розглядатися як ефективна модель для вивчення регуляції генів та експресії генів і може в потенціалі стати біокомбінатом з виробництва цінних лікарських препаратів.

Кріопротекторні властивості антифризних протеїнів риб

Антифризні протеїни – це протеїни, що виробляються в печінці деяких видів бореальних риб (*морські організми, що мешкають в помірній області Північної півкулі*) і в організмі багатьох безхребетних, які містять у своєму складі велику кількість аланіну.

Вони ефективно захищають організми риб та інших водних тварин *від замерзання плазми крові або гемолімфи при негативних значеннях температури води*.

Антифризні протеїни специфічно адсорбуються на поверхні, де утворюються кристалики льоду, запобігаючи тим самим їх подальшому розростанню, взаємодіють з мембранами клітин, а також здатні пригнічувати процеси рекристалізації. Ці властивості обумовлені унікальною четвертинною структурою антифризних протеїнів – у порівнянні з відомими в даний час кріопротекторами вони в 500 разів більш ефективно знижують температуру замерзання різних розчинів, а також біологічних об'єктів.

У процесі тривалої еволюції костисті риби виробили специфічні механізми зниження точки замерзання крові та інших екстраклітинних біологічних рідин без істотної зміни значень їх осмотичного тиску. Особливо розвинені такі механізми у риб, що мешкають у холодних морських водах.

Точка замерзання морської води становить близько $-1,8^{\circ}\text{C}$. Експериментально було встановлено, що риби, в плазмі яких відсутні антифризні протеїни, замерзають і при більш високих температурах, на відміну від риб, що мають в плазмі крові високі рівні антифризних протеїнів і здатних перезимувати в суворих умовах навколишнього середовища. Однак **лососеві риби**, а також інші комерційно важливі види риб не здатні синтезувати антифризні протеїни. Тому через різке переохолодження в

зимові місяці біля східного узбережжя Канади, де щорічний прибуток від торгівлі продуктами аквакультури сягає 100 млн. дол. США, гине велика кількість лососів, вирощуваних у садках.

Останнім часом у вищевказаних країнах були зроблені зусилля з **отримання трансгенних лососів з вбудованими генами антифризних протеїнів риб**. Результати цих експериментів показали високу ефективність таких підходів в аквакультурі – трансгенні лососі відрізнялися підвищеною стійкістю до низьких температур, що відкриває можливість вирощування лососів і в північних регіонах. Аналогічні результати були отримані і у **форелівництві**.

Ксенотрансплантація сперматогоній

Встановлено, що розвиток донорних сперматогоній можливий не тільки в організмі стерильних триплоїдних самців риб одного і того ж виду, але і в близькоспоріднених видах (ксенотрансплантація). Це має важливе значення для збереження видового різноманіття популяцій риб з природних водойм шляхом кріоконсервації зародкових клітин і для отримання сурогатних риб. Гамети риб, що мають великі розміри і тривалий період статевого дозрівання, можна отримувати за порівняно короткий час у сурогатних рибках, що мають невеликі розміри і нетривалий період статевого дозрівання. Досягти цього можна за допомогою ксенотрансплантації сперматогоній цільових видів риб відповідним реципієнтам (рис. 5).

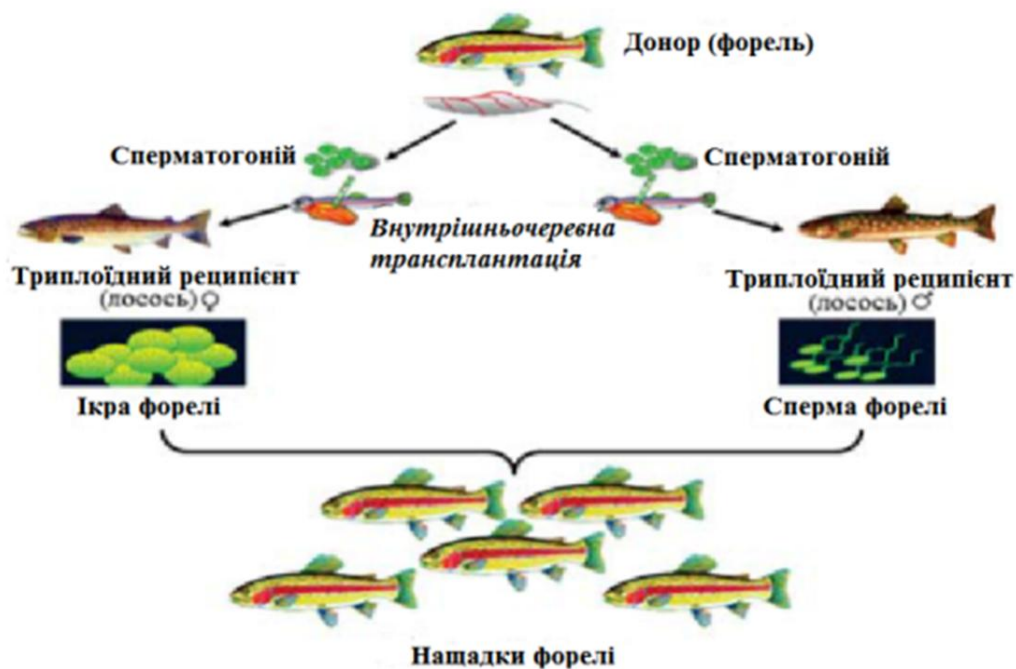


Рис.5. Ксенотрансплантація сперматогоній

Така технологія економічно доцільна, оскільки скорочує площі для розведення риб в аквакультурі і економить значні ресурси і час. Крім того, вона має велике значення для збереження видового різноманіття популяцій риб з природного середовища шляхом застосування кріоконсервованих зародкових клітин. Схема досвіду збереження зникаючих видів риб представлена на рис. 6.



Рис.6. Спосіб збереження рідкісних і зникаючих видів риб

Вплив на репродуктивні процеси. Інтерес до статі деяких видів риб, особливо осетрових і лососевих, обумовлений двома основними причинами. Одна з них – одержання одностатевих самок з метою виробництва великих кількостей ікри, друга – ці риби є зручною моделлю вивчення диференціації статі нижчих хребетних.

Отримання одностатевих самок необхідне також для вирішення проблеми раннього дозрівання самців лососевих риб (близько 60% самців дозрівають пізніше за інших, що знижує їх товарну цінність).

В останні роки кількість господарств, які **вирощують одностатевих самок**, зростає. Створення таких самок проводять у два етапи – на першому отримують одностатевих самців-реверсантов, потім, при схрещуванні їх зі звичайними самками, – одностатевих самок. Отримання одностатевих самців-реверсантів (XX) досягається шляхом обробки молодих особин риб низькими дозами андрогенів. Саме в ранній період розвитку риб можлива ефективна реверсія статі. Зазвичай з цією метою

використовують такі андрогени, як метилтестостерон, метилдегідростерон (МДНТ), або гідроксиандростенідіон (ВПА).

Отримані таким чином самці поділяються на два типи особин:

1. Фенотипічні самці з жіночим генотипом (містять 2 X-хромосоми). Ці одностатеві самці (реверсанти) при схрещуванні зі звичайними самками дадуть в потомстві 100% самок з генотипом XX.

Нормальні генетичні самці (містять як X-, так і Y-хромосоми).

Ці два вищевказаних типи самців фенотипово не розрізняються між собою. Виявити відмінності між ними можна лише **при гістологічних дослідженнях або реципрокним схрещуванням**, що займає багато часу. Тому в останні роки для прискореного виявлення самців-реверсантів (з XXгенотипом) в багатьох країнах були розроблені **молекулярно-біологічні методи, засновані на ДНК-технологіях**.

Було встановлено, що до зміни статі **райдужної форелі призводило комбіноване згодовування двох форм тестостерону**. Про це свідчили як результати методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), так і зміни у гонадах експериментальних особин риб – у деяких з них у процесі реверсії одночасно були присутні як жіночі, так і чоловічі статеві залози, деякі особини форелі були стерильні. Як показали результати проведених досліджень, специфічні олігонуклеотидні праймери до фрагмента Yхромосоми райдужної форелі ампліфікували очікуваний за розміром фрагмент ДНК. Довжина ПЛР-продукту склала близько 800 пар нуклеотидів.

Таким чином, за допомогою методу ПЛР були ідентифіковані **генотипи самців райдужної форелі**. Слід зазначити, що застосування ПЛР для виявлення реверсантів стало можливим після виявлення канадськими дослідниками у чавичі та озерної форелі повторюваних (близько 200 разів) послідовностей ДНК розмірами 8, 16, 24 і 32 т.п.н. на Y-хромосомі. Була розроблена ПЛР-діагностика самців, широко використовується в сучасному рибництві. З метою діагностики ДНК виділяють з плавників або з крові, і риба залишається живою.

В даний час розроблено велику кількість молекулярних маркерів для різних видів лососевих риб.

ТЕМА: ТРАНСГЕННІ ПТАХИ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою отримання трансгенних птахів.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Створення ліній трансгенних сільськогосподарських тварин трудомістке через досить **тривалий період їх статевого дозрівання, відносно низьку плодючість і високу вартість окремої тварини.** З цієї точки зору трансгенна птиця володіє великими перевагами і багато лабораторій світу працюють над проблемою її отримання. Однак особливості розмноження такої птиці створюють серйозні проблеми для дослідників.

Курка утворює на добу одну запліднену яйцеклітину, яка дуже велика і придатна для будь-яких маніпуляцій з нею, як це робиться з яйцеклітинами ссавців при їх ін'єкції чужорідної ДНК.

Для нормального ембріонального розвитку пташиної яйцеклітини необхідні третинні оболонки – **білкова, підшкаралупна і шкаралупа.** Дроблення курячої яйцеклітини починається вже в білковому відділі яйцепроводу, а у свіжознесеному яйці є вже 50-60 тисяч клітин. **Тому перша трансгенна птиця була отримана за допомогою ретровірусних векторів.**

Ретровіруси були головними претендентами на роль векторів для перенесення генів тому, що **в нормальних умовах вони самі включаються в геномну ДНК господаря і реплікуються.** Тому багато дослідників намагалися внести чужорідні гени у зародкову лінію, інфікуючи ембріони як здатними до реплікації, так і такими, що втратили здатність до реплікації ретровірусними векторами. Успішне вбудовування трансгена в цих дослідах склало від 0,8 до 5%. **Введення рекомбінантного вектора лейкозу птахів у бластодерму курячих ембріонів,** дало позитивний результат щодо перенесення генетичного матеріалу в зародкову лінію. З рекомбінантним вірусом були отримані повні трансгени. Дослідження щодо подальшої розробки технології використання ретровірусів з метою отримання трансгенеза у птахів видаються важливими і продовжуються до теперішнього часу.

Створення ліній трансгенних сільськогосподарських тварин трудомістке через досить **тривалий період їх статевого дозрівання, відносно низьку плодючість і високу вартість окремої тварини.** З цієї точки зору трансгенна птиця володіє великими перевагами і багато лабораторій світу працюють над проблемою її отримання. Однак особливості розмноження такої птиці створюють серйозні проблеми для дослідників.

Курка утворює на добу одну запліднену яйцеклітину, яка дуже велика і придатна для будь-яких маніпуляцій з нею, як це робиться з яйцеклітинами ссавців при їх ін'єкції чужорідної ДНК.

Для нормального ембріонального розвитку пташиної яйцеклітини необхідні третинні оболонки – білкова, підшкаралупна і шкаралупа. Дроблення курячої яйцеклітини починається вже в білковому відділі яйцепроводу, а у свіжознесеному яйці є вже 50-60 тисяч клітин. Тому перша трансгенна птиця була отримана за допомогою ретровірусних векторів.

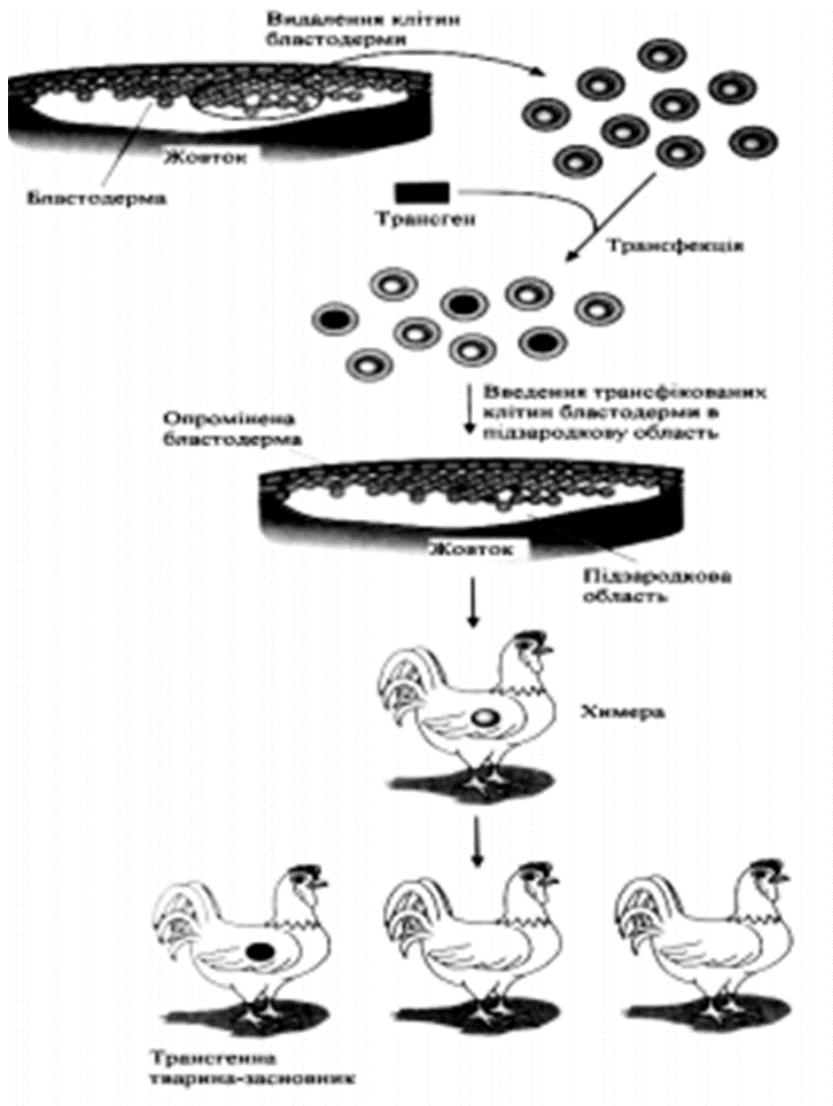


Рис. 7. Створення трансгенної птиці

Ретровіруси були головними претендентами на роль векторів для перенесення генів тому, що **в нормальних умовах вони самі включаються в геномну ДНК господаря і реплікуються**. Тому багато дослідників намагалися внести чужорідні гени у зародкову лінію, інфікуючи ембріони як здатними до реплікації, так і такими, що втратили здатність до реплікації ретровірусними векторами. Успішне вбудовування трансгена в цих дослідах склало від 0,8 до 5%. **Введення рекомбінантного вектора лейкозу птахів у бластодерму курячих ембріонів**, дало позитивний результат щодо перенесення генетичного матеріалу в зародкову лінію. З рекомбінантним вірусом були отримані повні трансгени. Дослідження щодо подальшої розробки технології використання ретровірусів з метою отримання трансгенеза у птахів видаються важливими і продовжуються до теперішнього часу. Створених химерних особин вирощують і отримують від них потомство. Деяка частина нащадків, що походять з трансгенних зародкових клітин, виявляються **трансгенними**. Головним недоліком цього підходу є **мала ефективність клітинних пересадок**. Згодом було показано, що клітини зародкової лінії можуть бути ефективно перенесені та інтегровані в ембріон.

Методичні прийоми **застосування ембріональних клітин в якості переносників чужорідної ДНК** з метою отримання трансгенної птиці продовжують розроблятися (рис. 8).

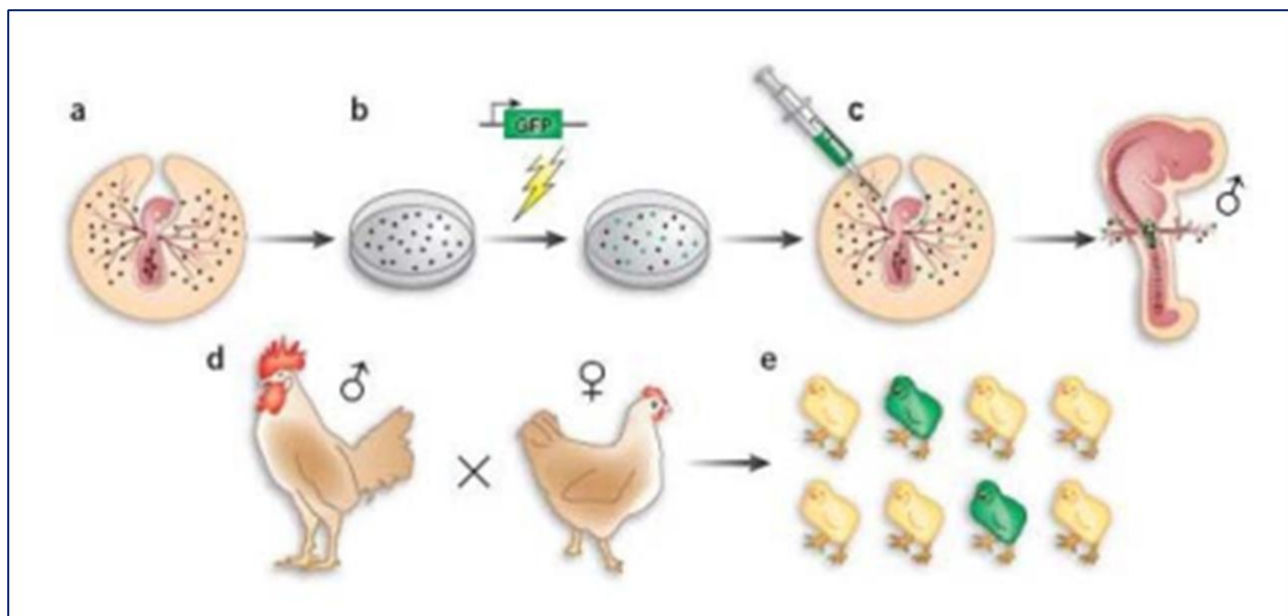


Рис. 8. Технологія отримання трансгенних ембріональних химер

Технологія отримання трансгенних ембріональних химер активно розвивається в таких країнах, як США і Японія, і на сьогоднішній день є основним претендентом на створення комерційно значущих трансгенних ліній птиці. Технологія ця вельми складна і дорога, включає такі стадії, як виділення і культивування первинних статевих клітин (а), їх подальшу трансфекцію чужорідною ДНК (b) і підсадку в ранні ембріони (с).

Отримання трансгенної птиці методом **штучного осіменіння**, традиційно і широко використовуваного в птахівництві прийому, виглядає дуже перспективно. Все більша кількість птахівників-селекціонерів говорить про майбутнє генно-інженерного конструювання нових промислових ліній і кросів з використанням, у тому числі, генофонду рідкісних і зникаючих порід птиці. Були проведені дослідження із застосування спермій у якості вектора переносу чужорідної ДНК в яйцеклітини курей. З використанням міченої ДНК було показано, що близько 80% радіоактивної ДНК знаходилося в сперматозоїдах.

Для збільшення ефективності переносу гена за допомогою сперматозоїдів (*sperm-mediated gene transfer, SMGT*) запропоновано доповнити метод використанням рестрикційних ферментів (*restriction enzyme mediated integration, REMI*). Лінійна ДНК разом з рестриктазою вводиться в клітину-мішень шляхом електропорації. Передбачається, що рестриктаза потім розрізає геномну ДНК для полегшення інтеграції екзогенної ДНК з відповідними «липкими» кінцями.

За використання сперматозоїдів півня, як вектору трансформації, отримані трансгенні курячі ембріони з генами β -галактозидази. Ефективність трансформації яйцеклітин склала 23% від кількості запліднених яєць.

Застосування технології мікроін'єкцій ДНК для птахів надзвичайно складне через феноменально великий розмір ооцита. Проте деякі дослідницькі колективи вивчали можливість такого підходу. Була зроблена спроба інкубувати *in vitro* запліднені курячі яйцеклітини, вилучені з верхньої частини білкового відділу яйцепроводу. На цій стадії курячий ембріон знаходиться на одноклітинній стадії розвитку, тому існує теоретична можливість проведення мікроін'єкції чужорідної ДНК.

Було показано, що існує можливість культивувати запліднену курячу яйцеклітину в шкаралупі з білком від іншої курки. Виявилось можливим подовжити *in vitro* ембріональний розвиток вилученої заплідненої яйцеклітини курки до стадії курчат, що вилупилися. В результаті – кількість життєздатних курчат, що вилупилися, отриманих з культивованих яйцеклітин, досягла 20%. Таке

культивування може використовуватися для різних експериментальних цілей, оскільки забезпечує доступ до ембріону, що розвивається, від одноклітинної стадії до стадії вилуплення. Різні стадії системи культивування можуть використовуватися окремо, залежно від експериментальних вимог.

Була досліджена можливість **ін'єкції чужорідної ДНК з наступним культивуванням ембріона**, як метод для отримання трансгенної птиці. Для ін'єкцій використовували **генну конструкцію з репортерним геном β -галактозидази**.

Результати ін'єкції чужорідної ДНК на стадії єдиної клітини, з подальшим укороченим культивуванням ембріона, показали, що включення введеної ДНК в хромосоми курчати порівняно рідкісна подія. Така інтеграція може бути замаскована присутністю позахромосомних копій введених плазмід.

Розроблений метод **прямої ін'єкції генної конструкції в цитоплазму свіжезаплідненої яйцеклітини курки**, з подальшою її інкубацією до вилуплення. Яйцеклітини для ін'єкції вилучали з білкової області яйцепроводу курки, де вони вже покриті тонким шаром білка, але без шкаралупи.

Виробництво трансгенних курчат цим методом – досить складне завдання. Тільки 50% ін'єктованих яйцеклітин доживає до стадії вилуплення, рівень її низький – в межах 15%. Однак аналіз на трансгенність ембріонів і курчат, отриманих в цих експериментах, вселяє надію.

При використанні **полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)** – було показано, що зразки ДНК від майже половини ембріонів і курчат, які прожили останні 12 днів культивування, містять трансген. Цим методом були отримані трансгенні кури і показано успадкування трансгена. Усі первинні трансгенні особини були мозаїчними. Надалі успадкування трансгена відбувалося відповідно до закону Менделя і при культивуванні до стадії вилуплення досягало близько 60% ембріонів. Однак, при відтворенні цієї методики в інших лабораторіях, цей показник не перевищував 3-10%.

Інший варіант **мікроін'єкцій ДНК в яйцеклітини птахів передбачає утворення третинних оболонок яйцеклітини природним чином – в статевих шляхах птиці**. В основі методу лежить хірургічна операція, яка забезпечує доступ до яйцеклітини, проведення в неї ін'єкції ДНК, і імплантацію назад в яйцепровід для формування повноцінного інкубаційного яйця.

Подальше вдосконалення цього методичного підходу дозволило проводити ін'єкції ДНК в яйцеклітини без їх вилучення зі статевих шляхів птиці, внаслідок чого істотно зросла ефективність методу. Цим методом були отримані **трансгенні кури з**

геном гормону росту людини, геном β -галактозидази, геном людського β -інтерферону та перепела з геном гормону росту бика. Основна перевага цього методу полягає у відсутності необхідності використання складної апаратури і середовищ для культивування ембріонів *in vitro*, виділення та пересадки бластодермальних або примордіальних (утворюються в процесі мітотичної проліферації первинних зародкових клітин (оогоній) клітин.

Таким чином, трансгенних птахів можна отримувати без використання ретровірусів, і створення трансгенних популяцій є здійсненним завданням. Для досягнення успіху і практичного використання трансгенні птахи повинні мати фенотип, який перевершував би рівень, вже досягнутий в птахівництві. Наприклад, збільшенням швидкості росту, поліпшенням конверсії корму, яйценосністю, зменшенням ожиріння тушки, збільшенням стійкості до захворювань і т.ін. Створення трансгенних птахів з генами, що забезпечують виробництво корисних фармацевтичних білків, що накопичуються в яйці, також може мати широке практичне використання.

Що стосується птахівництва, то використання трансгенозу для перенесення корисного гена навіть від однієї лінії птиці до іншої (що досягне звичайними селекційними методами) дає мінімум 7-8 річний вигравш і економію коштів за рахунок виключення зворотних схрещувань, необхідних для видалення непотрібних генів, що передаються при природній статевій гібридизації. Однак, справжні вигоди від переносу генів будуть зрозумілі з часом після створення і повного вивчення отриманої трансгенної птиці.

ТЕМА: ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНІ ОРГАНІЗМИ І БІОБЕЗПЕКА

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з перевагами та недоліками використання ГМО та природою ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища, пов'язаних з їх використанням.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

ГМО, агрономічно важливі характеристики рослин; змінені поживні властивості та склад ГМ-продуктів. Основним із постулатів необхідності широкого розповсюдження ГМО є потреба інтенсифікації розвитку сільського господарства. Згідно прогнозам населення Землі до 2050 року може сягнути 8-10 млрд. Тому вкрай потрібні абсолютно нові технології, що дозволять більш повно

використовувати біологічний потенціал рослин. Саме ГМ-рослини, що мають змінені певні агрономічні та фізіологічні характеристики (стійкі до певних гербіцидів, шкідників і хвороб, до засолення, дії високих і низьких температур; склад, тривалість збереження, термін визрівання) і вирішать цю гостру проблему.

Нині ГМО поступово завойовують світ. На даний час трансформовано близько 140 видів різних рослин. Комерціалізовано (отримано дозвіл на вирощування у відкритих системах з промисловою метою, на використання як харчових продуктів чи як корму для тварин) відносно невелику їх кількість.

На світовому ринку трансгенних культур широко представлені: картопля, рапс, бавовна, соя, цукровий буряк, кукурудза, папайя, люцерна та деякі інші рослини. Причому трансгенна соя поширена вже більше, ніж звичайна: її частка у світових посівах становить майже 80%, а в США – майже 90%.

Останнім часом у галузі генної інженерії перелік завдань, які вирішують дослідники, значно розширився. Якщо перші роботи були зосереджені насамперед на трансформації рослин за ознаками, що можуть мати певне значення для сільського господарства (стійкість до вірусів, певних гербіцидів і шкідників), то зараз спектр питань у цьому напрямку значно більший. На сьогодні існують **три покоління ГМ-культур**:

ПЕРШЕ ПОКОЛІННЯ – рослини, модифіковані з метою надання їм стійкості до біотичних і абіотичних факторів:

- стійкість до комах-шкідників (СК – стійкий до комах; англ. *IR – insect resistance* або *Bt – Bacillus thuringiensis* – бактерії, гени якої використовуються) – модифікації кукурудзи, бавовнику;

- стійкість до використання гербіцидів (ГС – гербіцидо-стійкий; англ. – *herbicide-tolerance crops*), тобто продовження життєдіяльності після загибелі оточуючих бур'янів – модифікації сої, кукурудзи, бавовнику, ріпаку.

- модифікації, стійкі до вірусних (наприклад, папайя), грибкових і бактеріальних інфекцій.

- культури, стійкі до абіотичних факторів (морозу, посухи тощо). У 2013 р. в США вперше почали вирощувати посухостійку кукурудзу.

Виведено модифікації культур, одночасно стійких до двох і більше факторів, тобто *стекерні* генні модифікації (кукурудза, стійка до гербіцидів і комах-шкідників).

ДРУГЕ ПОКОЛІННЯ – рослини, модифіковані з метою поліпшення їхніх властивостей. Наприклад, насіння олійних культур зі зміненим профілем жирних

кислот, високо-амілазна кукурудза, лінії рослин із підвищеним вмістом незамінних амінокислот, мінералів і вітамінів. Також відомий «золотий» рис, який містить значну кількість провітаміну А. Подібні процеси, спрямовані на збільшення кількості поживних речовин, називаються *біофортificaцією*.

ТРЕТЄ ПОКОЛІННЯ – організми, які модифіковано з метою використання при виробництві ферментів, хімічних сполук для фармакологічних препаратів, пластмас, здатних розкладатися тощо. Дослідження знаходяться на початковому етапі.

У 2013 р. майже 18 млн фермерів у 28-ми країнах світу засіяли біотехнологічними культурами 175,2 млн га. Це понад чотири ріллі України.

Ще в 31-й країні надано дозвіл на імпорт і використання ГМ-рослин як продуктів харчування та кормів. Посівні площі під культурами з привнесеними ознаками збільшилися у період з 1996 р. по 2023 р. (з початку комерційного впровадження трансгенних культур) у 100 разів, що є безпрецедентним у новітній історії сільського господарства.

У 2023 р. на ринок трансгенних культур допущено та культивуються понад 30 ліній ГМ-культур, переважна кількість яких належить до першого покоління, зареєстровано ГМ-культур: 27 ліній сої, 130 – кукурудзи, 3 – ріпаку, 7 – рису, 1 – пшениці, 31 – картоплі, 11 – томатів, хоча комерційно вирощується значно менша кількість ліній кожної культури.

Зараз акцент уваги перенесено на зміни біохімічних властивостей культур, які стосуються поліпшення смакових властивостей і збагачення їх корисними для людини речовинами. Зокрема, існують культури зі зміненим складом: вуглеводним – лінія картоплі, жирнокислотним – 7 ліній сої, амінокислотним – 2 лінії кукурудзи, а також 41 лінія кукурудзи зі зміненим метаболізмом вуглеводів та 8 ліній цієї рослини зі зміненою альфа-амілазною активністю.

Лідером вирощування ГМ-культур залишаються США – біотехнологічні рослини в 2023 р. займали площу 70,1 млн га, що становить 40% усіх сільськогосподарських угідь, зайнятих під ГМ-культури в світі.

До переваг вирощування культур стійких до гербіцидів відносять:
- зменшення витрат на обробку ґрунту, машинне обладнання та паливе;

впровадження технологій захисту ґрунту або вирощування без його обробки, що додатково економить кошти (людські та паливні ресурси, зайняті на обробці ґрунту), а також зменшення ерозії ґрунту, додаткове утримання вологи;

підвищення ефективності боротьби з бур'янами зменшує час збору культури, зростає рівень якості врожаю;

зниження потенційного ризику через надлишок гербіцидів у ґрунті, які можуть зашкодити культурі в наступному сезоні, та зменшення витрат на гербіциди в подальших сезонах у результаті підвищення ефективності боротьби з ними.

ГМ-культури, стійкі до комах-шкідників (СК-культури), – відрізняються від ГМ-культур, стійких до гербіцидів. СК-культури завдяки модифікації можуть продукувати певні білки, токсичні для різних видів комах-шкідників.

Основні переваги вирощування стійких до комах культур:

- скорочення витрат палива (обробка інсектицидами відбувається з повітря);
- скорочення витрат на механізацію, збільшення вільного часу фермерів у результаті скасування процедури обприскування інсектицидами;
- поліпшення якості зерна за рахунок зменшення рівня мікотоксинів (у деяких країнах, наприклад, Іспанії та Філіппінах фермери отримують премію за продаж якісного зерна кукурудзи);
- зменшення шкоди здоров'ю фермерів через використання інсектицидів, що особливо актуально серед бідних фермерів у країнах, що розвиваються, через слабкі засоби індивідуального захисту.

В Україні ГМО у промислових масштабах з'явилися у 1997 р., коли «Монсанто» розпочала висаджувати ГМ-картоплю сорту «Новий лист» на експериментальних полях у Волинській, Ровенській, Черкаській та Київській областях. У 1999 р. біоТНК отримала висновок МОЗ на «Новий лист», як на безпечний продукт. «Монсанто» навіть хотіла зробити Україну своїм плацдармом у Європі і глобальним експортером насіння картоплі. Але у червні 1999 р. Мінагропром виніс негативний висновок, і 1300 т ГМ-картоплі було поховано на землях колгоспу ім. Шевченка Черкаської обл.

Природа ризиків для здоров'я людини та навколишнього середовища, пов'язаних з ГМО

Питання заборони чи, як мінімум, обмеження використання ГМО зумовлено, насамперед, тим, що проблема можливого впливу ГМО на людину та і біосферу є недостатньо вивченою. Навіть захисники ГМО не дають твердої гарантії їх безпеки. Однак, з їх точки зору, ризик є виправданим. Можна виділити декілька **основних аспектів потенційної небезпеки ГМО.**

З огляду впливу на агроєкосистеми та природні біоценози:

1. Можливість переносу генів ГМ-культур на диких родичів модифікованих культур. Один із наслідків – зниження біологічного різноманіття.

2. Горизонтальний перенос генів на немодифіковані сорти рослин тих самих, що і модифіковані, видів.

3. Формування нових рас комах, стійких до Bt-токсинів, котрі утримуються у відповідним чином модифікованих культурах.

4. Стійкі до шкідників культури можуть виявитися небезпечними як для шкідників, так і для інших безхребетних (як не пов'язаних, так і пов'язаних між собою трофічними ланцюгами).

5. Провокування підвищеного використання хімічних засобів захисту при культивування гербіцидостійких ГМ-рослин.

6. Можливість появи «супербур'янів» (ген стійкості до гербіцидів може передаватись на споріднені рослини різними шляхами: анемохорія (*пасивне поширення плодів, насіння, спор та ін. повітряними течіями, іноді на досить великі відстані*), анемофілія (*вітрозапилення*), через пилок).

БІОЛОГО-СОЦІАЛЬНО-ЕКОНОМІЧНІ НАСЛІДКИ ВИКОРИСТАННЯ ГМО:

1. ГМ-культури, що використовуються у харчових продуктах, можуть привносити в них нові алергени, внаслідок чого постраждають люди з підвищеною чутливістю до алергенів.

2. Привнесення до рослин генів резистентності до антибіотиків, що використовуються біотехнологічними компаніями як маркери, може зумовити підвищену стійкість патогенної мікрофлори людини до відповідних бактерій.

3. Підвищення рівня токсичних речовин у рослинах.

4. Монополізація сільськогосподарських ринків корпораціями, що випускають ГМ-рослини за рахунок закупівлі насінневих компаній.

ГЕНЕТИЧНИЙ РИЗИК ТА БІОБЕЗПЕКА У БІОІНЖЕНЕРІЇ

Вбудова в ДНК реципієнтної клітини чужорідного донорського гена співпорядковано з певними труднощами, головними з яких є:

- забезпечення точної адресної вставки гена чи групи генів, а також їх нормального функціонування – експресії. Ця проблема існує постійно і її вирішення у багатьох випадках поки що носить у значній мірі випадковий характер;

- можливого отримання мутантів, що створюють токсичні чи алергенні для

людини білки або інші небезпечні сполуки. Реальний ризик, пов'язаний з появою чужорідного гена у реципієнтній клітині, гіпотетично завжди присутній. Це, перш за все, може бути зумовлено плейотропним ефектом (плейотропія - явище множинної дії гена. Виражається в здатності одного гена впливати на кілька фенотипічних ознак. Таким чином, нова мутація в гені може вплинути на деякі або всі пов'язані з цим геном ознаки);

- можливого індукування ендогенних систем рекомбінації і активації генів, що «мовчать»;

- спонтанний перенос із пилюком в інші рослини генів-модифікаторів, при взаємодії яких можлива поява нових генотипів з небезпечними для людини і довкілля властивостями.

Все це дає підстави вважати, теоретично можливим виникнення при трансгенозі генотипів, небезпечних для здоров'я і життя людини. Ризик отримання таких мутантів значно збільшується при використанні штучних, синтетичних генів для отримання трансгенних рослин, тварин і мікроорганізмів з поліпшеними і принципово новими властивостями.

ПОКАЗНИКИ І МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОБЕЗПЕКИ ГМО ТА ОТРИМУВАНИХ ІЗ НИХ ПРОДУКТІВ

Важливим етапом оцінки біобезпеки ГМО і отриманих з них харчових та інших продуктів є санітарно-гігієнічна експертиза, яку проводять за рядом показників: хімічний склад вихідних і трансгенних рослин, біологічної цінності і рівню засвоєння продуктів, приготовлених із ГМО, виявлення токсичних, канцерогенних, мутагенних і алергенних речовин у продуктах, отриманих на основі використання ГМО, оцінці впливу ГМО на репродуктивні функції тварин і людини.

ВИПРОБУВАННЯ ГЕНЕТИЧНО ЗМІНЕНИХ РОСЛИН НА БІОБЕЗПЕКУ ЗДІЙСНЮЮТЬ ЗА НАСТУПНИМИ НАПРЯМКАМИ:

- перевірка генів, інтегрованих до геному рослин на здатність до успадкування та переносу до інших рослин,
- оцінка впливу нових генів на стійкість рослин до хвороб і шкідників;
- виявлення і аналіз характеру мінливості ґрунтової мікрофлори та інших складових біоценозу під впливом транс генних рослин.

Обов'язковою і вкрай важливою є медико-біологічна оцінка харчової продукції, отриманої із ГМО.

Використання сучасних біотехнологій і впровадження ГМО має бути зваженим. З одного боку, потрібно враховувати переваги, які може принести нам їх промислове використання, а з іншого, необхідно гарантувати суспільству, що ці

технології не завдаватимуть шкоди здоров'ю людини та довкіллю. Існують певні застереження, що безконтрольне вивільнення ГМО може призвести до порушення екологічного балансу та виникнення загрози біологічному різноманіттю.

В Порядку денному на 21 століття, що був прийнятий на Конференції ООН з навколишнього середовища і розвитку в червні 1992 року в Ріо-де-Жанейро, Бразилія вказується що біотехнологія може внести значний вклад в забезпечення стійкого розвитку людства і зазначається про необхідність дотримання вимог «...екологічно безпечного регулювання біотехнологій...» або біологічної безпеки.

Біологічна безпека є новим терміном, що не так давно увійшов у наше життя і ним визначають зусилля, націлені на зменшення або недопущення потенційних ризиків, пов'язаних із застосуванням біотехнології та її продуктів.

Конвенція ООН про біологічне різноманіття признає що біотехнологія, якщо вона розробляється і застосовується з належними мірами по забезпеченню безпеки для навколишнього середовища і здоров'я людини може сприяти досягненню цілей конвенції, а саме «... збереженню біологічного різноманіття, стійкому використанню його компонентів і спільному отриманню на справедливій і рівній основі вигод, пов'язаних з використанням генетичних ресурсів».

На виконання статті 19 Конвенції про біологічне різноманіття та відповідно рішенню П/5 другої конференції Сторін Конвенції (Джакарта, листопад 1995 р.) в 1996р. робочою групою міжнародних експертів була започаткована розробка Протоколу про біобезпеку. Протокол планували схвалити взимку 1999 року в місті Картахена, Колумбія, але Сторони не дійшли згоди, і робота над документом продовжувалась ще рік. 29 січня 2000 року Протокол був схвалений на другій нараді Екстраординарної Конференції Сторін Конвенції про біологічне різноманіття, (м. Монреаль, Канада), для розробки механізмів його імплементації, був створений Міждержавний комітет по Картахенському протоколу про біобезпеку.

11 вересня 2003 року Протокол офіційно вступив в силу після того, як його ратифікували більш як 50 країн світу. Верховна Рада України прийняла Закон України про приєднання до Картахенського протоколу про біобезпеку до Конвенції про біологічне різноманіття 12 вересня 2002 року і На даний час разом з майже 130 країнами світу є повноцінною Стороною Протоколу.

Картахенський протокол про біобезпеку до Конвенції ООН про біологічне різноманіття є першим міжнародним документом який регулює відносини між країнами в сфері поводження з генетично модифікованими організмами і його основна мета – встановити міжнародні правила для країн, що його ратифікували, стосовно безпечного перевезення, обробки та використання ЖЗО, «які можуть мати несприятливий вплив на збереження і стале використання біологічного різноманіття, з урахуванням також ризиків для здоров'я людини». Особлива увага в документі приділяється регулюванню транскордонного переміщення ЖЗО.

Основну увагу цей документ приділяє живим зміненим організмам,

призначеним для вивільнення в довкілля (наприклад, насіння, дерева або риба). Якщо сторона планує експортувати такі ЖЗО, то має, відповідно до процедури «попередньої обґрунтованої згоди», заздалегідь поінформувати про це країну-імпортера. Якщо країна погоджується прийняти ці ГМО, вантаж позначається як «живі змінені організми», що імпортуються згідно з вимогами Картахенського протоколу.

В Україні, як і в багатьох інших країнах світу, на даний час не існує окремого закону з питань біобезпеки, чіткої системи регуляції біотехнологічних продуктів, що призводить до неконтрольованого поширення на території країн генетично модифікованих організмів.

З метою створення потенціалу в галузі біобезпеки і допомоги окремим країнам, відібраним ГЕФ, в підготовці до вступу в силу Картахенського протоколу про біобезпеку, в листопаді 2000 року Рада Глобальної Екологічної Фундації (GEF Council) на своїй 16 нараді схвалила спільний проект Програми з довкілля 00Н та Глобальної Екологічної Фундації.

ТЕМА: ВИВЧЕННЯ ЗАХИСНОЇ ДІЇ КРІОПРОТЕКТОРІВ НА СТІЙКІСТЬ КЛІТИН ДО ДІЇ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

МЕТА ЗАНЯТТЯ: вивчити вплив різних кріопротекторів на стійкість клітин до низьких температур.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Кріопротектор – речовина, що захищає живі об'єкти від шкідливої дії заморожування. Кріопротектори використовують при **кріоконсервації** – низькотемпературному зберіганні живих об'єктів (іншими словами, при заморожуванні клітинних культур, крові, сперми, ембріонів, ізольованих органів і біологічних об'єктів цілком).

При заморожуванні на живі об'єкти впливають два фактори ушкодження: формування внутрішньоклітинного льоду і зневоднення. Переміщення живих об'єктів у розчини кріопротекторів і заморожування в цих розчинах знижує або виключає повністю формування внутрішньоклітинного льоду і зневоднення.

При дії негативних температур в міжклітинниках рослинних тканин утворюються кристали льоду, що призводить до ушкодження клітинних мембран і зневоднення цитоплазми. За відповідного ступеня зневоднення, індивідуального для кожної рослинної клітини, цитоплазма починає коагулювати.

Кристали льоду можуть утворюватися і безпосередньо в клітинах. Вони

механічно діють на мембрани цитоплазми, порушують проникність плазмалеми, а при тривалій експозиції на морозі спричинюють загибель клітин, швидкість відмирання яких залежить від температури, часу експозиції та водоутримуючої здатності самої клітини.

Вітрифікація – це фізико-хімічний процес затвердіння розчинів без утворення кристалів льоду (склоподібно-аморфний стан), що спостерігається при високих швидкостях охолодження. Тобто вітрифікація – процес переходу рідини у твердий аморфний стан при надшвидкому заморожуванні (10^6 – 10^{10} град/с). Однак досягнення таких швидкостей охолодження навіть стосовно малих об'ємів біологічних об'єктів досить проблематично, а стосовно великих – практично неможливо.

Вітрифікації можна досягти і за більш повільного охолодження, але за умови додавання високих концентрацій кріопротекторів, що може запобігти об'єднанню молекул води в кристали і, відповідно, запобігти утворенню льоду. При цьому чим більше концентрація кріопротектора, тим менша швидкість охолодження потрібна для вітрифікації і навпаки. Однак стабільність вітрифікованого стану біооб'єктів досить невисока, що створює небезпеку прояву кристалізаційних процесів на етапі відігріву.

Перевагою вітрифікації є відсутність основних факторів пошкодження – кристалізації, дегідратації та концентрації солей. Проблеми виникають при вітрифікації об'ємних біологічних зразків. У великих заморожених об'єктах можуть виникати температурні градієнти, що може спричинити їх розтріскування. І очевидно, що чим більший об'єм зразка, тим більші температурні градієнти можуть виникати при його охолодженні чи відігріванні.

Найчастіше та успішно вітрифікацію використовують для кріоконсервування ранніх (преімплантаційних) ембріонів людини, лабораторних та сільськогосподарських тварин. У цьому випадку говорять про «вітрифікацію ембріонів». Також проводять вітрифікацію сперматозоїдів та ооцитів, що допомагає боротися з безпліддям.

Надшвидке заморожування використовують також для зберігання меристимальних (зародкових) тканин рослин. Збільшення кількості кріопротекторів у зимуючих органах рослин підвищує водоутримуючу здатність тканин та призводить до підвищення їх морозостійкості.

Існує велика кількість речовин, що володіють кріопротекторними властивостями, але в медичній і лабораторній практиці використовують не більше

десятка з'єднань. Розрізняють кріопротектори двох типів:

- проникаючі;
- непроникаючі.

До **проникаючих** відносять кріопротектори, що проникають всередину клітини. Проникаючі кріопротектори перешкоджають формуванню кристалів льоду за рахунок утворення водневих зв'язків з молекулами води. Найпоширеніші проникаючі кріопротектори: *гліцерин, пропіленгліколь, етиленгліколь, диметилсульфоксид*.

До **непроникаючих** відносять кріопротектори, які не проникають всередину клітин. Принцип дії непроникаючих кріопротекторів до кінця не визначений. Ймовірно, завдяки двом факторам: зниження швидкості росту кристалів і захист клітини від осмотичних перепадів.

До непроникаючих кріопротекторів відносять дві групи речовин: **олігосахариди** (найчастіше використовують *сахарозу і трегалозу*) і **високомолекулярні сполуки** (найчастіше використовують *фікол, альбумін, полівінілпіролідон*).

Використання непроникаючих кріопротекторів за відсутності проникаючих неефективно, тобто непроникаючі кріопротектори є додатковими компонентами в розчинах проникаючих кріопротекторів.

Після розморожування живі об'єкти необхідно звільнити від кріопротекторів.

ХІД РОБОТИ

1. Для приготування охолоджувальної суміші змішують три частини снігу чи льоду з однією частиною кухонної солі. Температура охолоджувальної суміші становить близько $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. З коренеплодів цукрових буряків вирізають декілька пластинок товщиною 5 мм.

3. За допомогою пробкового свердла діаметром 5-6 мм роблять висічки з цих пластинок.

4. Висічки ретельно промивають водою до повного видалення решток клітинного соку і по три-чотири поміщають в пробірки. Пробірки підписують відповідно до схеми досліду:

- в пробірку № 1 наливають 5 мл дистильованої води (контроль);
- в пробірку № 2 – 2,5 мл 1 М розчину сахарози і 2,5 мл води;
- в пробірку № 3 – 5 мл 1 М розчину сахарози;
- в пробірку № 4 – 2,5 мл 1 М розчину гліцерину і 2,5 мл води;

- в пробірку № 5 – 5 мл 1 М розчину гліцерину;
- в пробірку № 6 – 2,5 мл 1 М розчину сахарози і 2,5 мл 1 М розчину гліцерину.

5. Пробірки з рослинним матеріалом на 15-20 хв поміщають в свіжоприготовлену охолоджувальну суміш, після чого їх обережно виймають і розморожують в стакані води кімнатної температури.

6. Після розморожування візуально проводять порівняння інтенсивності забарвлення висічок і кольору рідин в пробірках, відзначають і пояснюють їх відмінності.

7. Для перевірки життєздатності клітин із аналізованих висічок виготовляють тонкі зрізи за допомогою скальпеля і препарувальної голки поміщають їх на предметне скло, накривають покрівельним скельцем, поміщають на столик мікроскопу і розглядають при збільшенні $\times 10$ в краплі розчину, в якому вони знаходились. Підраховують в одному полі зору загальну кількість і число знебарвлених клітин, з яких відбулося видалення бетаціаніну.

8. Визначення життєздатності клітин можна проводити також шляхом плазмолізу. Для цього тонкі зрізи клітин із аналізованих висічок поміщають на 10 хв в 8% розчин NaCl. Після чого препарати продивляються під мікроскопом і підраховують відсоток плазмолізованих клітин в полі зору (не менше п'яти полів зору).

9. Результати досліду занотувати і зробити висновки про захисну дію кріопротекторів на цитоплазму рослинних клітин.

ТЕМА: ОСОБЛИВОСТІ ВИМИВАННЯ ЕМБРІОНІВ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою нехірургічного вимивання ембріонів ВРХ.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Ефективним методом біотехнології прискореного розмноження високоцінних племінних тварин є **трансплантація ембріонів**. Поглиблені дослідження репродуктивної функції тварин, її можлива регуляція, мікрохірургічні маніпуляції із зародками показали, що метод трансплантації є основою прискореного відтворення високопродуктивних корів і цілих популяцій. Практичне застосування цього методу в молочному скотарстві забезпечує інтенсивне розмноження тварин з високою генетичною цінністю, прискорене отримання високоцінних племінних биків,

матерями яких є видатні родоначальниці, сприяє підвищенню ефективності племінної роботи, оздоровленню стад від ряду захворювань.

Ефективність методу трансплантації ембріонів залежить від способу вимивання ембріонів, кваліфікації спеціалістів, умілого використання інструментів, приладів. Після запліднення ембріон за 4-5 днів проходить яйцепровід і на стадії ранньої морули (8-16 клітин) надходить в порожнину матки для подальшого розвитку. Ще через 2-3 дні він розвивається до бластоцисти. Саме на цій стадії розвитку (7-8 днів) найкраще одержувати і пересаджувати ембріони. Крім того, на цій стадії розвитку ембріони добре переносять кріоконсервування і розморожування.

До середини 70-х років ембріони в корів видобували **хірургічним методом** з яйцепроводів або з рогів матки в залежності на якій стадії проводили операцію. При цьому застосовували наступні методи:

- видобування ембріонів через розріз верхнього склепіння піхви – трансвагінальний метод;
- часткової гістероектомії за допомогою кастраційних щипців в донорів, які вибраковуються і здаються на забій;
- з геніталій забитих тварин;
- шляхом лапаротомії по білій лінії, який частіше застосовувався на телицях;
- шляхом лапаротомії в області голодної ямки.

Але на сучасному етапі впровадження трансплантації ембріонів великої рогатої худоби хірургічні методи застосовуються більше з наукових цілей.

Останнім часом в умовах практичного застосування трансплантації ембріонів використовують лише **нехірургічний метод вимивання ембріонів**. Цей спосіб відносно простий і надійний, дозволяє успішно одержувати ембріони безпосередньо на тваринницьких фермах, використовуючи донора багаторазово (до 20 і більше разів) майже без зниження його відтворювального потенціалу.

Тварину фіксують у станку, звільняють пряму кишку від калових мас, оцінюють стан статевих органів, визначають кількість жовтих тіл на кожному яєчнику. Зовнішні статеві органи й оточуючу їх ділянку обробляють теплою водою з милом і дезінфікують.

Для часткового знерухомлення тварин вводять препарати ксилазину: рометар, седазин в дозі 0,1 мл на 100 кг живої маси внутрішньовенно. З метою знеболення органів тазової порожнини та зняття напруження прямої кишки проводять сакральну епідуральну анестезію введенням 5 мл 2% розчину новокаїну між останнім крижовим і першим хвостовим хребцями. Якщо через

5-7 хв

знерухомлення хвоста не настає, анестезію повторюють.

Для вимивання ембріонів використовують здебільшого модифікаційний двоходовий катетер Фоллея чи триходовий катетер виробництва французької фірми «IMW», останній на практиці використовується рідше через складність будови і високу вартість.

При використанні двоходового катетера фірми «Minitúb» і його модифікацій вітчизняного виробництва, на всю довжину катетера вставляють металевий стилет та інструмент обережно вводять в один із рогів матки, постійно контролюючи цей процес через пряму кишку. Перед введенням катетера, його бажано зростити препаратом «Керолан» або змазати водорозчинним гелем "К-У".

Найскладнішим моментом техніки вимивання ембріонів є проведення катетера через шийку в роги матки. Якщо катетер введений у шийку, але його просування затруднене внаслідок вузькості проходу (телиці-донори) або утворення спайок в каналі (наслідки важких отелень), то використовують спеціальні дилататори (розширювачі). Використовують металеві та скляні дилататори без отвору або з отвором, куди надходить слиз. Після розширення каналу шийки матки введення катетера повторюють. Інструменти повинні бути в санітарних чохлах, які розривають у момент підведення їх до каналу шийки матки.

Катетер фіксують, наповнюючи повітряний балончик з допомогою шприца 10-15 см повітря. Показником правильного розміщення інструмента в розі матки є вільний вихід прозорої промивної рідини з матки. Відсутність рідини після вливання через катетер буває через одну із причин: проколення рога матки; перегинання катетера під час його введення; закупорка отворів слизом. Забарвлення рідини кров'ю свідчить про: травмування ендометрію при введенні катетера (особливо з металевим наконечником); надмірне наповнення повітряного балончика; стоншення ендометрію внаслідок захворювання матки.

Використовуючи двоходовий катетер, можна промивати роги матки двома методами: порційним і гравітаційним.

Порційний метод більш простий і практичний в умовах ферм і непристосованих приміщень. Підігріту до 30-40°C вимивну рідину вводять через зафіксований катетер шприцом порціями по 30-50 мл, проводять легкий масаж рога і зворотний збір рідини в цей же шприц. Середовище після кожного взяття зливають у зливну посудину або пропускають через фільтр. На один рог матки використовують 300-500 мл середовища.

Головним недоліком методу є недостатній контроль при введенні-виведенні

розчинів, що може призвести до переповнення рога, затікання середовища в яйцепровід за балончик або до геморагічного пошкодження ендометрію. Внаслідок відкритого перенесення рідини метод не мав достатнього асептичного захисту.

Гравітаційний метод промивання вигідний у стаціонарних умовах центрів і пунктів, він є атравматичним і має закриту систему обігу промивної рідини, захищену від попадання забруднень із зовнішнього середовища (рис. 9).

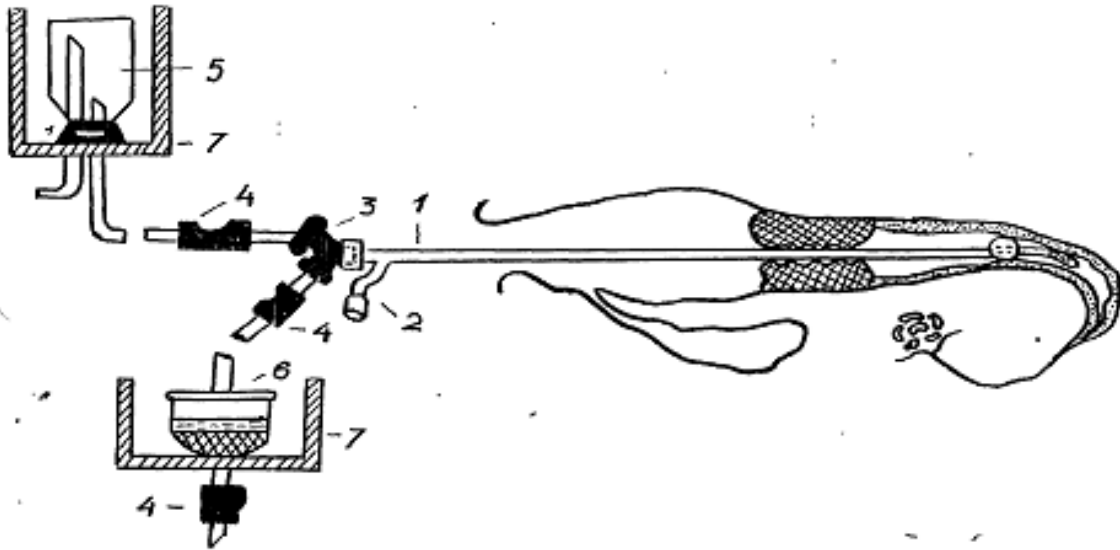


Рис. 9. Схема вимивання ембріонів гравітаційним способом

- 1 - катетер фірми "MINITUB"; 2 - канал для нагнітання повітря в балончик;
 3 - двійний перехідник; 4 - затискач; 5 - середовище Дюльбекко; 6 - посудина з ситечком для збирання ембріонів; 7 -термостат

При цьому способі трубки з силікону чи іншого біологічно нешкідливого матеріалу з'єднують з катетером Фоллея через скляний, пластмасовий або металевий трійник. На впускній і випускній трубках встановлені ручні затискачі. Флакон із середовищем встановлюють на рівні 1 м над донором, а зливну посудину (чи фільтр) – якомога ближче до підлоги. На одне промивання рога матки витрачають від 20 до 70 мл рідини.

З метою ефективнішої роботи та скорочення часу при вимиванні і пошуку ембріонів доцільно використовувати спеціальні фільтри для проціджування середовища. Вимивне середовище пропускають через фільтр, у корпусі якого залишають постійно 50-60 мл середовища і вимиті ембріони. Після цього фільтр змивають і проводять пошук ембріонів.

Приготування і використання середовищ. Середовища для короткотривалого забезпечення життєздатності гамет мають простіший склад, ніж для тривалого культивування чи розмноження клональних клітин.

У практиці трансплантації ембріонів великої рогатої худоби для вимивання ембріонів широко використовується фосфатно-сольове буферне середовище Дюльбекко (ФБС). Безпосередньо перед його використанням додають піруват натрію – 0,036 г/л, глюкозу – 1,0 г/л; фетальну сироватку теляти (ФСТ) з розрахунку 10-20 г на 1 л або 4 г бичачого сироваткового альбуміну (БСА). При застосуванні вимивних фільтрів краще використовувати БСА для запобігання утворення піни розчинів, що ускладнює пошук ембріонів.

Для короткотривалого культивування чи зберігання ембріонів використовують середовище Дюльбекко, яке відрізняється від вказаного підвищеним вмістом фетальної сироватки (20-30%). Його використовують і при заморожуванні ембріонів завдяки властивості стабільно підтримувати рН у процесі заморожування. У цьому випадку до середовища, крім названих компонентів, додають ще й кріопротектори, серед яких широко застосовують гліцерин, сахарозу, в концентраціях відповідно, 1,0-1,4 М і 0,25-0,5 М.

Найпоширенішими середовищами для культивування ембріонів є мінімальне середовище Ігла (МЕМ), мінімальне середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (ДМЕМ), середовище для тканинних культур ТСМ-199, стабілізоване буфером НЕРЕС. До їх складу входять неорганічні солі, амінокислоти, вітаміни, фактори росту, ліпіди.

При застосуванні вищевказаних середовищ для культивування і зберігання ембріонів, їх спочатку стабілізують буфером НЕРЕС, а безпосередньо перед використанням обов'язково додають фетальну сироватку крові великої рогатої худоби (10 мл на 100 мл середовища) або бичачий сироватковий альбумін (4 г на 1 л середовища), а також один з антибіотиків (пеніцилін – 100 од./мл, гентаміцин – 50 мг/мл, ампіцилін – 50 од/мл).

ТЕМА: ПОШУК ТА МОРФОЛОГІЧНА ОЦІНКА ЕМБРІОНІВ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою пошуку та морфологічної оцінки ембріонів.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Після вимивання ембріонів промивне середовище переносять у стерильний бокс, де воно відстоюється 20-30 хв при температурі не нижче +25°C. Верхню частину відстояного середовища відсмоктують у попередньо приготовлену посудину за допомогою шприца і тонкої прозорої трубки, залишаючи 60-80мл. Відстояне середовище розливають у 2-3 чашки Петрі, які для зручності пошуку ембріонів ззовні розграфлені на квадрати 10x10 мм. Посудина, в якій проводилось осадження ембріонів, і ситечко, через яке проціджували промивне середовище, споліскують чистим розчином Дюльбекко за допомогою шприца і розливають в чашки Петрі для відшукування ембріонів.

Якщо у середовищі є багато слизу і крові, то необхідно розлити його в чашки Петрі у меншій кількості, розбавивши його середовищем Дюльбекко, і обережно маніпулюючи голкою, досліджувати слиз. Після перегляду середовища в одній площині, чашкою Петрі потрібно зробити 2-3 обертові рухи, щоб виключити втрати ембріонів, які можуть прилипнути до стінки чашки.

Під мікроскопом МБС-9, МБС-10 при 15-20-кратному збільшенні знаходять ембріони і мікропіпеткою переносять їх у маленьку чашку Петрі з поживним середовищем. Перед використанням поживне середовище обов'язково проціджують через фільтри Millipore (діаметр 0,22 мкм). Після короткотривалого витримання у поживному середовищі ембріони оцінюють під мікроскопом при збільшенні в 100-150 разів.

Для спрощення і прискорення техніки виявлення ембріонів використовують спеціальні пристосування. Їх можна розділити на дві групи: седиментаційні, які базуються на властивості ембріонів опускатися під власною вагою на дно посудини, і фільтраційні, розраховані на діаметр пор фільтрів до 60 мкм, через які не може пройти ембріон.

Найпростіший пристрій фірми IMW складається із зігнутої металевої трубки, загнутої внизу, яка має отвір для відбору рідини з літрової посудини приблизно на рівні 80-100 мл. Осад з ембріонами на цьому рівні залишається після видалення надосадової рідини методом сифону. Для повільного витікання рідини на відвідній трубці є ручний регулюючий затискач.

Головною умовою використання будь-яких пристосувань седиментаційної дії є відсутність втрат з витікаючою надосадовою рідиною та внаслідок прилипання зародків до стінок і перехідних стиків. Використання фільтруючих елементів при зборі ембріонів у 2-3 рази скорочує час їх виявлення. Виробляють зручні в роботі фільтри (діаметр 80 мкм) поєднані з чашкою для пошуку ембріонів (рис. 10).

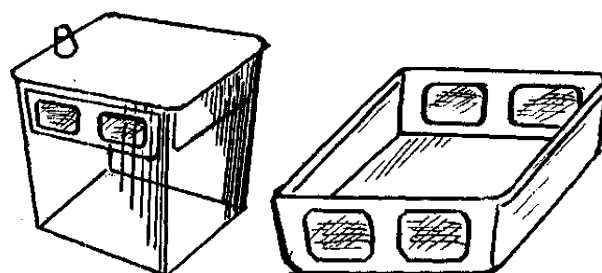


Рис.10. Фільтр для пошуку ембріонів

Після закінчення промивання рогів матки донора така розграфлена чашка з невеликою кількістю залишеної рідини переноситься безпосередньо під мікроскоп. Час від одержання промивного середовища до виявлення ембріонів – 10-15 хвилин. Головна умова при використанні всіх фільтруючих систем – ретельне промивання потоком середовища фільтруючих елементів, де можуть затримуватися ембріони.

Виявлені ембріони і яйцеклітини переносять у чисті стерильні середовища для оцінки якості і санітарної обробки. Їх кількість може відповідати або перевищувати кількісь жовтих тіл в яєчниках донора. Причиною недоодержання передбачуваної кількості ембріонів і яйцеклітин можуть бути захворювання яйцепроводів (сальпінгіти, пухлини) у донора, або втрати при вимиванні, відстою, фільтрації. У першому випадку донора вибраковуюють, у другому – знаходять і усувають причину втрат вимивної рідини і ембріонів.

Після виявлення ембріонів їх переносять у чисте середовище, а потім методом поступового відмивання звільнюють від крові і бактеріального забруднення. Суть методу прогресуючого розчинення полягає у тому, що відмивання ембріонів у декількох стерильних середовищах знижує концентрацію вірусів і бактерій до безпечного субінфекційного рівня вже після третьої чашки із стерильним середовищем.

Технічно метод відмивання ембріонів полягає у поступовому перенесенні мікропіпеткою ембріонів з мінімальною кількістю рідини (біля 0,01 мл) з одної стерильної чашки з 1 мл розчину середовища у другу. Розбавлення концентрації початкового розчину таке, що з третьої чашки перевищує 1000 разів, а в дев'ятій чашці середовище вважають стерильним. Додаткові гарантії блокування мікробної контамінації дає додавання в середовище антибіотиків.

Будь-які маніпуляції з ембріонами проводять стерильними інструментами у хімічно чистих посудинах. При відсутності бактерицидних ламп і одноразових

інструментів, у тимчасовій виїзній лабораторії використовують стерилізацію 70 % етиловим спиртом і кип'ятінням.

Маніпуляції з ембріонами проводять поблизу спиртівки, відкрите полум'я якої створює стерильні умови у радіусі 20 см. У стаціонарних лабораторіях роботу з пошуку, оцінки і мікроманіпуляцій з ембріонами проводять у ламінарних шафах, які забезпечують потік профільтованого чистого повітря.

Морфологічна оцінка ембріонів. Перед трансплантацією ембріонів необхідно оцінити їх якість. Для цього існує декілька способів: морфологічна оцінка під мікроскопом, короткотривале культивування, використання барвників тощо. На практиці в основному використовують морфологічні методи оцінки.

Головна мета ембріолога – визначити приховані дефекти розвитку ембріона, із збільшенням частки яких зменшуються шанси виживання ембріона після пересадки.

Після вимивання ембріонів проводять морфологічну оцінку їх якості. При цьому враховують нижче наведені критерії окремих структурних компонентів ембріонів.

Прозора оболонка (*zona pellucida*) – тріщини в оболонці нативних і розморожених ембріонів вважають відхиленням від норми, оскільки вони пов'язані з травмуванням і деформацією зародків під час маніпуляцій, а також з можливим утворенням кристалів солей і води при кріоконсервуванні.

Перивітеліновий простір – в ідеалі вільний від включень (бластомерів, їх фрагментів і залишків цитоплазми).

Клітинна маса – при нормальному розвитку на стадії морули темна, чітко окреслена, з виступаючими бластомерами, які нагадують щільне виноградне гроно. Просвітлення (розпушення) клітинної маси, розпливчасті межі бластомерів або їх лізис, поява цитоплазматичних гранул серед зруйнованих бластомерів належить до дефектних ознак і вважається неприпустимими.

Бластопорожнина – має важливе значення при оцінці якості деконсервованих ембріонів. Її тимчасове стиснення – функціонально обернена ознака, яка не свідчить про дефектність ембріона.

Біологічно якісними і здатними до подальшого розвитку після трансплантації вважають ембріони, які мали правильну кулясту форму, непошкоджену прозору оболонку, однакового розміру бластомери з щільним міжклітинним сполученням. За рівнем дроблення вік ембріонів повинен відповідати періоду від запліднення яйцеклітин до моменту вимивання.

Неповноцінними вважають ембріони, які мають будь-які з вище означених дефекти та відстають в розвитку.

Стадію розвитку ембріонів визначають за кількістю бластомерів і циклів дроблення. Подвоєння кількості бластомерів в ембріонах великої рогатої худоби відбувається приблизно через 12 годин за винятком 1-го циклу дроблення. Бластомери якісних ембріонів мають округлу або овальну форму.

Рання морула характеризується початком ущільнення клітин, бластомери не завжди однакової величини, що залежить від можливого асинхронного поділу, утворення мікро- і макробластомерів. Деякі клітини виступають в перивітеліновий простір, що допускається.

Для компактної морули характерним є закінчення процесу ущільнення бластомерів, рівномірності розташування клітинної маси, яка займає 60-80 % перивітелінового простору, вільного від бластомерів.

Нерідко у вимивному середовищі знаходять незапліднені яйцеклітини у стані дегенерації, які мають зморщену, неправильної форми, інколи зруйновану цитоплазму. Дегенерованим яйцеклітинам властива неправильна форма перивітелінового простору через розрив оолеми, фрагментація цитоплазми, оскільки фрагментарний розпад ооплазми, що є ознакою можливого некрозу, призводить до утворення псевдобластомерів.

При класифікації ембріонів користуються чотирибальною системою:

1) *відмінні* (++): ембріони, вік яких відповідає стадії розвитку, однорідні, мають округлу форму, непошкоджену прозору оболонку, прозорий перивітеліновий простір, чіткі однакові за розміром бластомери.

2) *добрі* (+): ембріони, вік яких відповідає стадії розвитку, однак, відрізняються від відмінних незначними відхиленнями – виділенням одного або двох бластомерів від клітинної маси; збільшенням перивітелінового простору, наявністю незначної кількості мертвих клітин в перивітеліновому просторі.

3) *задовільні* (+-): ембріони із значними відхиленнями в структурі бластомерів – неоднорідним затемненням клітинної маси, наявністю мертвих клітин або їх фрагментів у перивітеліновому просторі.

4) *незадовільні* (-): ембріони з часто деформованою прозорою оболонкою, наявністю до 50 % затемненої маси, що свідчить про значну дегенерацію бластомерів, порушеним зв'язком між бластомерами, їх ущільненням і зморщенням (рис. 11-13).

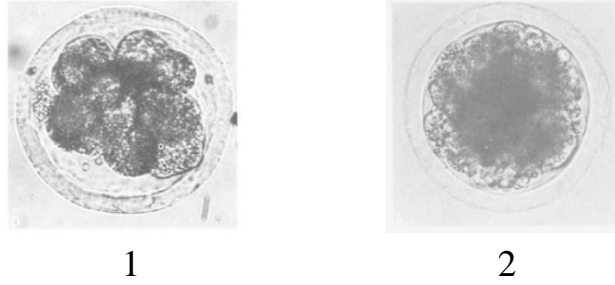


Рис. 11. Морули відмінної якості

1 – рання морула; 2 – компактна морула

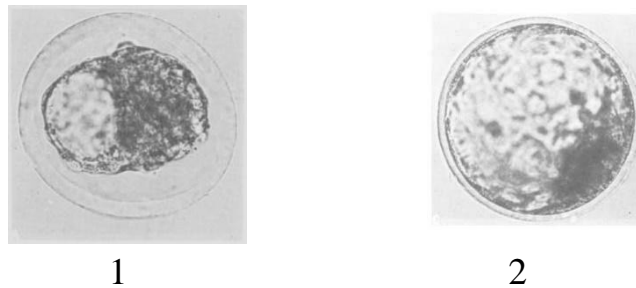


Рис. 12. Бластицисти відмінної якості

1 – бластоциста рання; 2 – бластоциста експандована

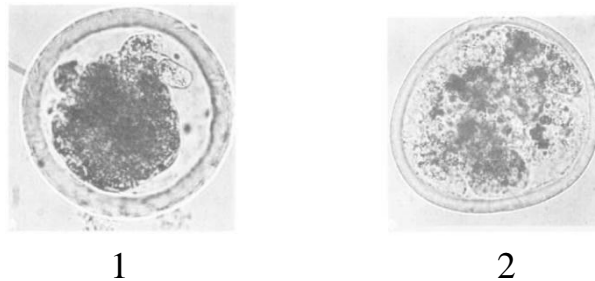


Рис. 13. Дегенеровані морули

1 – дегенерована рання морула; 2 – дегенерована компактна морула.

Відмінні, добрі і задовільні ембріони вважають придатними або умовно придатними до кріоконсервації та пересадки. Інші за морфологічними ознаками оцінюють як непридатні до трансплантації і заморожування, сюди включають і незапліднені яйцеклітини.

ТЕМА: НЕХІРУРГІЧНА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ ЕМБРІОНІВ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися з методикою нехірургічної пересадки ембріонів ВРХ.

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Суть нехірургічного методу трансплантації зводиться до трансцервікального введення інструмента з ембріоном у просвіт рога матки. Підготовка реципієнтів аналогічна підготовці донорів для нехірургічного вимивання ембріонів. Тварину фіксують у станку, зовнішні геніталії і перинеальну ділянку ретельно миють теплою водою з милом, і роблять сакральну епідуральну анестезію 2% розчином новокаїну (5 мл). Для часткового знерухомлення реципієнтів внутрішньовенно (у хвостову вену) вводять препарати ксилазину (рометар, седазин) в дозі 0,1 мл на 100 кг живої маси. В окремих випадках тваринам вводять матковий міорелаксant внутрішньом'язово за 15-20 хвилин до пересадки ембріонів.

Нехірургічну пересадку ембріонів проводиться за допомогою спеціальних катетерів. Найбільш поширені катетери фірм «Minitüb» (Німеччина) та ІМW (Франція). Катетер фірми "Minitüb" складається з металевої трубки, зйомного наконечника і стилета, а фірми ІМW — із металевої трубки, стилета та одноразового запасного чохлика, що дозволяє використовувати його безліч разів, міняючи чохлики. Для пересадки ембріонів коровам-реципієнтам, фірмою ІМW розроблено катетер, у якому всередині металевої трубки знаходиться телескопічний зонд, що дозволяє вводити його у верхівку рога матки.

Підготовка інструментів для пересадки ембріонів проводиться в стерилізаційній кімнаті. Катетери стерилізують кип'ятінням протягом 20 хвилин, висушують або стерилізують сухим жаром при температурі 160-180°C 60 хвилин. Санітарну обробку інструментів і робочого місця проводять 70 % етиловим спиртом, ультрафіолетовим опроміненням. Французькі катетери комплектуються стерильними разовими чохлами, які не потребують додаткової стерилізації. На стерильний катетер або разовий чохлик натягують санітарний чохлик, який захищає інструмент від забруднення та інфекції до входження його в шийку матки.

Перед початком пересадки проводять ректогенітальну пальпацію яєчників у телиць, які були в охоті у день осіменіння донора (для персадок свіжоодержаних ембріонів) або синхронних з віком заморожених ембріонів (день охоти дорівнює 0). При цьому оцінюють наявність або відсутність жовтого тіла статевого циклу (+ або -) і фіксують, на якому яєчнику воно сформоване (лівий або правий). Також

визначають якість жовтого тіла: відмінне (++)), добре (+), або сумнівне (\pm). Відмінне жовте тіло може бути у вигляді грибка або чітко вираженого піку, яєчники правильної яйцеподібної форми, причому розміри яєчника порівняно з жовтим тілом, як правило, більші в два і більше разів. Менш виражена жовте тіло, нетипова форма яєчника (у вигляді вісімки, трикутника, диска та ін.), наявність з жовтим тілом фолікулів чи кист, знижує його якість до оцінки добре (+). Сумнівне жовте тіло (\pm) може незначно збільшуватися у вигляді рисового зерна, знаходиться на яєчнику дещо меншого розміру (до 1,5 см) при гіпофункції, розлита і невиражена його конфігурація може свідчити про персистентність жовтого тіла, м'яка консистенція – про кістозне переродження (лютеїнова кіста. Пересадки ембріонів реципієнтам з сумнівним жовтим тілом ведуть до втрати тільності і виконують їх у виняткових випадках.

Дані про якість і розміщення жовтого тіла реєструють у картці реципієнта. За 5-7 хвилин до розміщення ембріона в катетер ембріолог дає номери телиць для проведення сакральної анестезії. Показником правильно проведеної блокади є повне розслаблення м'язів кореня хвоста. При відсутності ефекту через 2-3 хвилини анестезію повторюють.

Нехірургічну трансплантацію реципієнтам молочних і комбінованих порід виконують як в стаціонарних, так і у виробничих приміщеннях на прив'язі. Якщо роботу планують на довготривалу перспективу, на фермі встановлюють нескладні зварювальні конструкції на 20-30 місць, які обмежують бокові переміщення реципієнтів. Пересадку ембріонів реципієнтам м'ясних порід виконують у станках з жорсткою фіксацією.

Перед пересадкою соломинку (пайєту) з ембріоном поміщають у катетер. Пайєту з ембріоном у катетер фірми «Minitüb» вставляють у зйомний наконечник, який приєднується до металічної трубки з стилетом, а у катетер фірми ІМW – безпосередньо в металічну трубку, після чого на неї насаджують одноразовий захисний чохлик.

Безпосередньо перед введенням у статеві органи інструмент зрошують кероланом або гелем «К-У» і поміщають в санітарний поліетиленовий чохлик.

Підготовлений до пересадки катетер у санітарному чохлаку обережно вводять у піхву до каналу шийки матки, проривають чохлик і під ректальним контролем вводять катетер через цервікальний канал у ріг матки, на стороні якого виявлено жовте тіло у яєчнику (рис. 14).

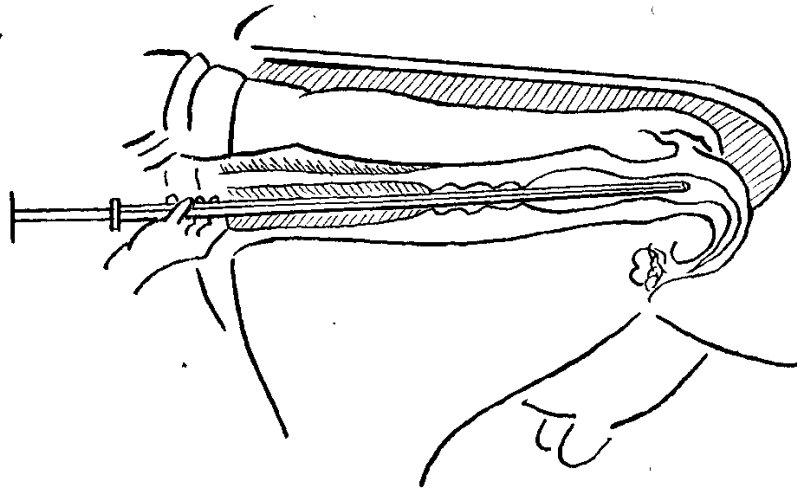


Рис. 14. Схема нехірургічної пересадки ембріонів

Обережними рухами просувають катетер якомога ближче до верхівки рога матки, постійно контролюючи ректальне положення передньої частини катетера. Впевнившись у правильності введення інструмента, помірним натисканням стилета катетера витискають вміст пайєти в просвіт рога матки. Після цього плавними і обережними рухами виймають катетер з порожнини матки. Аналогічним чином можна ввести катетер у другий ріг матки при білатеральній пересадці ембріонів.

При трансплантації ембріонів декільком реципієнтам після пересадки кожного ембріона катетер миють, дезінфікують спиртом його внутрішню порожнину, промивають стерильним середовищем Дюльбекко, вставляють пайєту з ембріоном, поверхню зрошують препаратом «Керолан» або змазують гелем «К-У», поміщають у санітарний чохлик і проводять пересадку.

У катетері французької фірми IMW знімають одноразовий захисний чохлик, заправляють пайєту з ембріоном, натягують новий чохлик, прикріплюючи його замком до металевої частини інструмента, проводять операції із зрошування поверхні аналогічно попередньому катетеру, вставляють катетер в санітарний чохлик і проводять пересадку.

Приблизно у 5% реципієнтів буває важкопрохідна і непрохідна шийка матки. Труднощі з проходженням шийки матки, як правило, не відбиваються на приживленні ембріонів. При неможливості провести катетер через шийку, його повертають у лабораторію для стерилізації і перезаряджання. В середньому на пересадку ембріона досвідчений спеціаліст витрачає 1-2 хвилини.

Телиці, які не підлягають трансплантації ембріонів внаслідок відсутності охоти та повноцінного жовтого тіла, можуть бути повторно використані в програмах синхронізації статевого циклу або передані для осіменіння.

Після закінчення пересадки тварин годують і утримують в звичайних умовах, не допускаючи стресових ситуацій.

Після пересадки ембріонів ведуть контроль за можливими проявами повторної охоти. З метою раціонального використання телиці, при виявленні у них після ембріопересадок статевої охоти (30-32-й день), осіменяють.

Потрібно строго контролювати випадки і частоту абортів тільних реципієнтів.

Через 60-90 днів після пересадки тварин досліджують на тільність методом ректальної діагностики. Кінцеві показники пересадки ембріонів вираховують за результатами отелень.

Нехірургічний метод трансплантації дозволяє транспортувати і пересаджувати свіжоодржані ембріони за декілька кілометрів від центру. Для цього заряджений катетер поміщають у теплий контейнер з температурою 37°C. Пайети з ембріонами для пересадки перевозять у цьому ж контейнері.

Після транспортування ембріонів перевіряють збереження встановленої послідовності заправки пайет повітрям та середовищем і за відсутності порушення заправляють пайету в катетер та проводять пересадку.

ТЕМА: ЗАКОНОДАВЧА БАЗА УКРАЇНИ З БІОБЕЗПЕКИ ТА ЇЇ РЕАЛІЗАЦІЯ

МЕТА ЗАНЯТТЯ: ознайомитися із законодавчою базою України з біобезпеки та її реалізація

ЗМІСТ І МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ЗАНЯТТЯ:

Останні роки ХХ століття характеризувалися бурхливим розвитком біотехнологій, заснованих на досягненнях молекулярної біології та генетики. Завдяки розробці методів виділення спадкового матеріалу (ДНК), його вивчення (ідентифікації послідовностей, що кодують певні гени), створення його нових комбінацій за допомогою маніпуляцій, здійснюваних поза кліткою, і перенесення цих нових генетичних конструкцій в живі організми з'явилася можливість створювати нові сорти рослин, породи тварин, штами мікроорганізмів, що мають корисні ознаки, які неможливо відібрати за допомогою традиційної селекції.

На сьогодні законодавство у сфері застосування біотехнологій в Україні лише починає формуватися. Його аналіз свідчить, що значна група законодавчих актів лише опосередковано регулює питання біобезпеки через загальні правові вимоги щодо охорони здоров'я людини, докiлля від впливу небезпечних факторів фізичної, хімічної та біологічної природи (передбачається облік цих факторів, визначення критеріїв їх впливу на здоров'я людини, здійснення контролю за їх впливом тощо).

До цих актів відносяться основи законодавства про охорону здоров'я, Закон України «Про лікарські засоби», Закон України «Про якість і безпеку харчових продуктів», Закон України «Про пестициди та агрохімікати», Закон України «Про екологічну експертизу» та деякі інші.

Наприклад, Законом України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя» (ст. 9) передбачається гігієнічна регламентація будь-яких небезпечних факторів біологічного характеру, визначення центрального органу виконавчої влади, відповідального за проведення робіт із гігієнічної регламентації небезпечних факторів, ведення Державного реєстру небезпечних факторів (у ньому мають наводитися назви небезпечних хімічних речовин і біологічних чинників, дані про їх призначення, властивості, методи індикації, біологічну дію, ступінь небезпеки для здоров'я людини, характер поведінки в навколишньому середовищі, виробництво, гігієнічні регламенти застосування тощо), встановлюється вимога щодо використання в народному господарстві та побуті будь-якого небезпечного фактора хімічної та біологічної природи лише за наявності сертифіката тощо.

Гігієнічна регламентація та реєстрація продуктів біотехнології проводяться відповідно до Положення про гігієнічну регламентацію та державну реєстрацію небезпечних чинників, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 13 червня 1995 р. № 420. Гігієнічна регламентація провадиться Комітетом з питань гігієнічного регламентування МОЗ і полягає в розробці спеціальних екологічних нормативів та інструкцій про поводження з продуктами біотехнології. Державна реєстрація останніх є умовою для видачі органами МОЗ дозволу на їх виробництво.

Відповідно до ст. 11 вказаного закону продукція, напівфабрикати, речовини, матеріали та небезпечні чинники, використання, передача чи збут яких може завдати шкоди здоров'ю людей (у тому числі й продукти біотехнології), підлягають обов'язковій санітарно-епідеміологічній експертизі, що здійснюється органами державної санітарно-епідеміологічної служби.

Відповідно до ст. 51 Закону України «Про тваринний світ» від 13 грудня 2001 р. створення нових штамів мікроорганізмів, біологічно активних речовин, виведення

генетично змінених організмів, виробництво інших продуктів біотехнології здійснюється лише в установленому порядку і за наявності позитивних висновків державної екологічної експертизи. Використання зазначених організмів і речовин за відсутності таких висновків забороняється. За загальним правилом клонування тварин в Україні чи застосування технологій генної інженерії до тварин без позитивного висновку державної екологічної експертизи, що здійснюється згідно з вимогами Закону України «Про екологічну експертизу» від 9 лютого 1995 р., забороняється.

Це стосується і трансгенних сортів рослин, і будь-яких інших біотехнологій, оскільки біохімічне, біотехнічне та фармацевтичне виробництво включені до Переліку видів діяльності та об'єктів, що становлять підвищену екологічну небезпеку, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 27 липня 1995 р. № 554. А відтак проекти впровадження будь-яких біотехнологій підлягають обов'язковій державній екологічній експертизі відповідно до ст. 13 Закону України «Про екологічну експертизу» від 9 лютого 1995 р. Крім того, щодо трансгенних рослин діє Тимчасовий порядок ввезення, державного випробування, реєстрації та використання трансгенних сортів рослин в Україні, затверджений постановою Кабінету Міністрів України від 17 серпня 1998 р. № 1304.

Виробництво, зберігання, транспортування, використання, захоронення продуктів біотехнології здійснюється з дозволу Міністерства природи та згідно з Порядком одержання дозволу на виробництво, зберігання, транспортування, використання, захоронення, знищення та утилізацію отруйних речовин, у тому числі продуктів біотехнології та інших біологічних агентів, затвердженим постановою Кабінету Міністрів України від 20 червня 1995 р. № 440.

Більш предметно питання біобезпеки вирішуються ст. 53 Закону України «Про охорону навколишнього природного середовища». За цією статтею підприємства, установи й організації зобов'язані забезпечувати екологічно безпечне виробництво, зберігання, транспортування, використання, знищення, знешкодження та захоронення мікроорганізмів, інших біологічно активних речовин і предметів біотехнології, розробляти та здійснювати заходи щодо запобігання та ліквідації наслідків шкідливого впливу біологічних факторів на навколишнє природне середовище і здоров'я людини.

Практичним результатом комерційного застосування сучасної біотехнології стало створення та вивільнення в навколишнє середовище генетично модифікованих організмів (далі – ГМО). Узагальнюючи формулювання з Картахенського протоколу

про біобезпеку до Конвенції про біологічне різноманіття від 29 січня 2000 р. (Картахена-де-Індіас, Колумбія; Монреаль, Канада) і Директиви 2001/18/ЄС Європейського парламенту та Ради Європейської Союзу ми визначаємо ГМО як будь-який організм, за винятком людського, у якому генетичний матеріал був змінений завдяки використанню сучасної біотехнології шляхом, відмінним від природного об'єднання та (або) природної рекомбінації. Основна мета документа – захистити навколишнє середовище від потенційних ризиків застосування живих генетично змінених організмів, одержаних завдяки методам сучасної біотехнології.

Картахенський протокол став першим юридично обов'язковим документом, який має на меті регулювання міжнародних перевезень генетично змінених організмів, гарантування безпеки під час переміщення, переробки генетично змінених організмів та їх використання і спрямований на захист біорізноманіття та здоров'я людей. У Протоколі особливу увагу приділено транскордонному переміщенню таких організмів. Цей документ не розповсюджується на транскордонне переміщення живих генетично змінених організмів у вигляді фармацевтичних препаратів для людини, питання щодо яких регулюються іншими відповідними міжнародними угодами чи організаціями.

Протокол передбачає обов'язкове проведення оцінки ризику перед застосуванням генетично змінених організмів у нових умовах (країнах) та процедуру попередньо обґрунтованої згоди сторін (держав), які здійснюють обмін, використання та застосування будь-яких живих генетично змінених організмів. Протокол вимагає від кожної сторони заходів щодо обробки, пакування та позначення живих генетично змінених організмів при їх транскордонному переміщенні.

Україна підписала Картахенський протокол, а також Нагойсько-Куала-Лумпурський додатковий протокол про відповідальність і відшкодування до Картахенського протоколу про біобезпеку, прийнятий 15 жовтня 2010 р. у м. Нагої. Протокол встановлює міжнародні правила й процедури відповідальності та відшкодування шкоди, яку можуть заподіяти біорізноманіттю генетично модифіковані організми.

Метою Протоколу є сприяння збереженню та сталому використанню біологічного різноманіття з урахуванням ризиків для здоров'я людини шляхом забезпечення міжнародних правил і процедур відповідальності та відшкодування, пов'язаних з генетично модифікованими організмами. Протокол застосовується у випадку завдання збитків у результаті транскордонного переміщення ГМО,

призначених для використання в якості харчових продуктів або корму, переробки в замкнених системах та умисного вивільнення в навколишнє середовище, а також до збитків, завданих в результаті неумисного та незаконного транскордонного переміщення ГМО.

У 2011 році Верховна Рада України розглядала законопроект «Про органічне виробництво». Документом визначаються правові, економічні, соціальні та організаційні основи ведення органічного сільського господарства, вимоги щодо вирощування, виробництва, перероблення, сертифікації, етикетування, перевезення, зберігання та реалізації органічної продукції та сировини. Законопроект, зокрема, містить положення, відповідно до якого органічна продукція повинна відповідати вимогам, встановленим для такої ж продукції, виробленої конвенційним (неорганічним) способом.

Згідно з документом виробництво може вважатися органічним лише після отримання відповідного сертифікату на виробництво органічної продукції та має проводитися виключно з органічної сировини, яка відповідає вимогам цього закону. Відповідно до документа в органічному виробництві має бути заборонено використання ГМО, похідних ГМО та продуктів, вироблених з ГМО (харчових продуктів, кормів, технологічних добавок). Також забороняється застосовувати хімічні препарати захисту рослин і добрив, використовувати іонізуючу радіацію для обробки органічних харчових продуктів, кормів або сировини, яка використовується в органічних харчових продуктах або кормах. Але вказаний закон так і не був підписаний і введений в дію.

Основними принципами державної політики в галузі генетично-інженерної діяльності та поводженні з генетично модифікованими організмами на сучасному етапі в Україні є:

- пріоритетність збереження здоров'я і охорони навколишнього природного середовища, порівняно з економічними перевагами від застосування ГМО;
- забезпечення заходів щодо дотримання біологічної і генетичної безпеки при створенні, дослідженні та практичному використанні ГМО в господарських цілях;
- контроль за ввезенням на митну територію України ГМО та продукції, отриманої з їх використанням, їх реєстрацією та обігом;
- загальнодоступність інформації про потенційні ризики від застосування ГМО, які передбачається використовувати у відкритій системі, та заходи щодо дотримання біологічної та генетичної безпеки;

- державна підтримка генетично-інженерних досліджень та наукових і практичних розробок у галузі біологічної і генетичної безпеки при створенні, дослідженні та практичному використанні ГМО в господарських цілях.

Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» від 31 травня 2007 р. регулює відносини між органами виконавчої влади, виробниками, продавцями (постачальниками), розробниками, дослідниками, науковцями та споживачами генетично модифікованих організмів і продукції, виробленої за технологіями, що передбачають їх розробку, створення, випробування, дослідження, транспортування, імпорт, експорт, розміщення на ринку, вивільнення у навколишнє середовище та використання в Україні із забезпеченням біологічної і генетичної безпеки. Водночас цей Закон не застосовується до людини, тканин та окремих клітин у складі організму людини.

Закон має виконувати такі завдання:

- охорона здоров'я людини і навколишнього природного середовища при здійсненні генетично-інженерної діяльності та поводженні з ГМО;

- забезпечення права громадян на безпечне використання ГМО;

- створення умов для безпечного практичного використання ГМО в господарських цілях;

- визначення прав і обов'язків суб'єктів регулювання при поводженні з ГМО та встановлення їх відповідальності за порушення законодавства;

- захист громадян у разі заподіяння шкоди їх здоров'ю, внаслідок споживання ГМО;

- встановлення правових основ міжнародного співробітництва в галузі генетично-інженерної діяльності та поводження з ГМО.

Регулюванню Законом підлягають:

1. Генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у замкненій системі. *Закрита система* — це система здійснення генетично-інженерної діяльності, при якій генетичні модифікації вносяться в організм або ГМО, культивуються, обробляються, зберігаються, використовуються, підлягають транспортуванню, знищенню або похованню в існуючих умовах систем захисту, що запобігають контакту з населенням та навколишнім середовищем.

2. Генетично-інженерна діяльність, що здійснюється у відкритій системі. *Відкрита система* — це система здійснення генетично-інженерної діяльності, що передбачає контакт ГМО з населенням та навколишнім середовищем при

запланованому вивільненні їх у навколишнє середовище, застосуванні у сільськогосподарській практиці, промисловості, медицині та в природоохоронних цілях, передачі технологій та інших сферах обігу ГМО.

3. Державна реєстрація ГМО та продукції, виробленої з їх використанням. *Державна реєстрація ГМО* – це занесення ГМО до реєстру з урахуванням оцінки їх ризику щодо впливу на здоров'я людини та стан навколишнього природного середовища з метою подальшого отримання дозволу на практичне використання ГМО в Україні відповідно до їх господарського призначення.

4. Введення в обіг ГМО та продукції, виробленої з їх використанням; експорт, імпорт і транзит ГМО. Обіг ГМО - це переміщення (транспортування) або зберігання та будь-які дії, пов'язані з переходом права власності чи володіння, включаючи продаж, обмін або дарування.

Забезпечення виконання Закону «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» покладено на центральні органи виконавчої влади у межах повноважень і в порядку, передбаченому законодавством України, зокрема на Кабінет Міністрів України (ст. 7), центральний орган виконавчої влади з питань освіти і науки (ст. 8), центральний орган виконавчої влади з питань екології та природних ресурсів (ст. 9), центральний орган виконавчої влади з питань охорони здоров'я (ст. 10), центральний орган виконавчої влади з питань аграрної політики (ст. 11).

Порушення вимог зазначеного Закону і прийнятих на його основі нормативно-правових актів тягне за собою цивільну, адміністративну, дисциплінарну або кримінальну відповідальність згідно із законом.

Відповідальність несуть особи, які винні у:

- приховуванні або перекрученні інформації, що може спричинити або спричинило загрозу життю та здоров'ю людини чи навколишньому природному середовищу;
- недотриманні або порушенні вимог стандартів, регламентів, санітарних норм і правил використання, транспортування, зберігання, реалізації ГМО;
- використанні незареєстрованих ГМО або продукції, отриманої з їх використанням (за винятком науково-дослідних цілей);
- порушенні правил утилізації та знищення ГМО;
- невиконанні законних вимог посадових осіб, які здійснюють державний нагляд і контроль.

На сьогодні в Україні поверхово регулюється діяльність у сфері застосування біотехнологій, немає чинного закону щодо діяльності, пов'язаної з ГМО. Великою прогалиною є те, що продовольчі товари, які містять ГМО, не перевіряються та ніяким чином не маркуються.

Органічне виробництво, яке мало б замінити застосування біотехнологій, також поки що не має правового регулювання, зокрема в законодавстві відсутні пільги та інші матеріальні стимули для суб'єктів, що займаються органічним виробництвом. Через це воно не набуло широкого розповсюдження.

Література

1. Біотехнології та біоінженерія. Вступ до фаху : навчальний посібник / О. І. Юлевич С. І. Луговий, О. І. Каратєєва, Є. В. Баркарь. Миколаїв : МНАУ, 2022. 285 с.
2. Білоконь С. В. Основи біоетики та біобезпеки: навчальний посібник / С. В. Білоконь. Одеса : Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, 2017. 155 с.
3. Генетичномодифіковані організми: ризики, міфи та реальність / О. М. Ковальова та ін. Біоетика та біобезпека: мультидисциплінарні аспекти : матеріали науково-практичної конференції за міжнародною участю (м. Харків, 23-24 травня 2017 р.). Харків. 2017. С. 70-72. URL: http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/16421/1/Гончарь_ОББ_2.pdf.
4. Нормативне забезпечення біотехнологічних виробництв. Управління якістю та безпека біотехнологічної продукції : навчальний посібник / Т. Ф. Козловська та ін. Кременчук : Видавництво КрНУ, 2017. 146 с.
5. Люта І. М. Ембріологічна характеристика результатів трансплантації ембріонів великої рогатої худоби. *Вісник аграрної науки Причорномор'я*. 2016. Вип. 2 (2). С. 16-22. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/1977>.
6. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія в агросфері : навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів. Київ, 2014. 247 с. URL: https://nubip.edu.ua/sites/default/files/biotehnologiya_v_agrosferi.pdf.
7. Біотехнологія. Практикум / М. Д. Мельничук та ін. Київ : ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2013. 150 с.
8. Біобезпека використання біотехнологій : конспект лекцій / уклад. Л. С. Патрева, І. М. Люта. Миколаїв : МНАУ, 2021. 110 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/9394>.
9. Салига Ю. Т., Лучка І. В., Росаловський В. П. Основи біобезпеки для науково-дослідних установ біологічного профілю. Львів : Растр-7, 2017. 218 с.
10. Юлевич О. І., Ковтун С. І., Гиль М. І. Біотехнологія : навчальний посібник / за ред. М. І. Гиль. Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/1025>.
11. Lyuta, I., Kovtun, S., Cherbak, O., Peredrii, N., & Lyzohub, O. (2021). Results of research on group formation donor cows and embryos transplanted. *Zhivotnovadni Nauki*, 58(1), 49-55 (Bg).
12. Trotskyi P. A., Shcherbak O. V., Lyuta I. M. (2020). Biotechnological approaches to the preservation and use of bovine ovarian cumulus-oocyte complexes in the system of reproductive technologies. *Agricultural Science and Practice*, 7(3), 54-61. <https://doi.org/10.15407/agrisp7.03.054>.

Навчальне видання

БІОБЕЗПЕКА ВИКОРИСТАННЯ БІОТЕХНОЛОГІЙ

методичні рекомендації

Укладачі:

Юлевич Олена Іванівна

Люта Ірина Миколаївна

Формат 60×84 1/16 Ум. друк. арк. 3,9

Тираж 15 прим. Зам № _____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
ДК № 4490 від 20.02.2013 р.