Перечень
информации о генно-инженерных организмах, относящихся к прочим организмам, отличным от высших растений, а также о мерах по предупреждению возможных вредных воздействий генно-инженерного организма на здоровье человека и окружающую среду

Заявитель:
Закрытое акционерное общество «Белорусская национальная биотехнологическая корпорация» (ЗАО «БНБК»)
222860, Минская область, Пуховичский район, Дукорский с/с, 27
тел./факс: 8(017) 555-40-61 (51)
E-mail: info@bnbc.by

Генно-инженерный организм: штамм-продуцент треонина *Escherichia coli* JUTH1801
Производитель штамма: Цзяннаньский университет (Jiangnan University), г. Уси, Китайская Народная Республика

1. Биологические особенности донорного и реципиентного организмов:

1.1. полное название:
Реципиентный организм (родительский штамм)
Домен: Бактерии (*Bacteria*)
Отдел: *Proteobacteria*
Класс: *Gammaproteobacteria*
Порядок: *Enterobacterales*
Семейство: *Enterobacteriaceae*
Род: *Escherichia*
Вид: *Escherichia coli*
Штамм: *Escherichia coli* ATCC 98082 (производный от типового штамма *Escherichia coli* K-12). Штамм является непатогенным и широко используется в качестве продуцента аминокислот. Геном реципиентного штамма депонирован в ГенБанке (номера доступа CP034658- CP034659)

Донорный организм
Домен: Бактерии (*Bacteria*)
Отдел: *Proteobacteria*
Класс: *Gammaproteobacteria*
Порядок: *Enterobacterales*
Семейство: *Enterobacteriaceae*
Род: *Escherichia*
Вид: *Escherichia coli*
Штамм: *Escherichia coli* ATCC 98082

1.2. степень родства между донорным и реципиентным организмами, информация о возможности обмена генетического материала между ними естественным путем:

донорный и реципиентный организмы являются одним и тем же организмом. Перестройки генома бактерий *Escherichia coli* являются частым явлением и зафиксированы в многочисленных вариантах (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/167/).

1.3. методы идентификации донорного и реципиентного организмов (фенотипические и генетические маркеры):

Идентификация бактерий *Escherichia coli* возможна с помощью физиолого-биохимических или молекулярно-биологических методов и детально изложена в руководстве Берджи по систематике архей и бактерий:

Scheutz, F. and Strockbine, N.A. (2015). Escherichia. In Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman). https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01147

1.4. методики, применяемые в лаборатории или природной среде для обнаружения, мониторинга, оценки количества донорного и реципиентного организмов, чувствительность, надежность и специфичность методики обнаружения и идентификации донорного и реципиентного организмов:

обнаружение, мониторинг и оценка количества бактерий *Escherichia coli* возможны только в лаборатории; для этого используют те же методы, что и при идентификации микроорганизмов. В Республике Беларусь действует ряд стандартов, которые регламентируют процедуру анализа кишечной палочки в различных биотопах:

- СТБ ISO 9308-1-2016. Качество воды. Подсчет количества кишечных палочек *Escherichia coli* и колиформных бактерий;
- ГОСТ 30726-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*;

и др. (https://tnpa.by/#!/SimpleSearch/search_value=Escherichia/tab=/page=/status=/state=/num_of_records=)

1.5. описание географического распространения и естественных мест обитания донорного и реципиентного организмов, включая информацию о естественных хищниках, жертвах, паразитах, конкурентах, симбионтах и хозяевах:

Бактерии *Escherichia coli* обитают в нижнем отделе кишечника теплокровных животных и являются частью нормальной микробиоты. *E. coli* попадают в окружающую среду с фекалиями и могут быть найдены в пищевых продуктах, предметах окружающей среды или воде при фекальном загрязнении. Бактерии *E. coli* легко выращиваются в лабораторных условиях и легко поддаются генетическим манипуляциям, что делает их одним из наиболее используемых модельных прокариотических организмов.

Паразитами бактерий *Escherichia coli* являются бактериофаги (колифаги), большинство из которых хорошо изучены. В настоящее время по данным Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) описано более 270 видов фагов, первоначально выделенных из *Escherichia* sp.

1.6. потенциальная возможность переноса и обмена генетической информацией с другими организмами:

Существует на уровне естественных процессов генетического обмена между микроорганизмами.

1.7. генетическая стабильность донорного и реципиентного организмов и факторы, влияющие на нее:

Перестройки генома и мутации, связанные с активностью транспозонов, очень распространены у бактерий *E. coli* K-12.

1. Kitamura K, Torii Y, Matsuoka C, Yamamoto K. DNA sequence changes in mutations in the tonB gene on the chromosome of Escherichia coli K12: insertion elements dominate the spontaneous spectra. Jpn J Genet. 1995 Feb;70(1):35-46. doi: 10.1266/jjg.70.35.

2. Gaffé J, McKenzie C, Maharjan RP, Coursange E, Ferenci T, Schneider D. Insertion sequence-driven evolution of Escherichia coli in chemostats. J Mol Evol. 2011 Apr;72(4):398-412. doi: 10.1007/s00239-011-9439-2.

Факторами, влияющими на генетическую стабильность бактерий, являются физические воздействия (радиоактивное, ионизирующее, УФ-излучения, ультразвук, экстремальная температура) или химические вещества (мутагены), а также некоторые биологические объекты (мобильные генетические элементы, вирусы).

1.8. патогенные, экологические и физиологические особенности донорного и реципиентного организмов:

Escherichia coli – это грамотрицательные палочковидные бактерии размером несколько микрон в длину и 0,5 мкм в ширину. Данные бактерии являются факультативными анаэробами, что обусловлено их основной экологической нишей обитания – кишечником теплокровных животных. Температурные диапазоны роста обычно находятся между 21°C и 37°C. *E. coli* нейтрофильны и растут в диапазоне pH от 5,0 до 9,0.

Клетки штамма *E. coli* K-12 являются ослабленными, в норме данные бактерии не способны колонизировать кишечник человека. Также было показано, что они плохо выживают в окружающей среде, и не оказывают вредного воздействия на другие микроорганизмы или растения. Поскольку *E. coli* K-12 широко используются в качестве модельного организма в исследованиях в области генетики и физиологии бактерий, а также в промышленных целях, они являются одним из наиболее широко изученных микроорганизмов с подтверждённой безопасностью (https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/fra004.pdf).

период генерации в естественных экосистемах, половой и бесполый репродуктивный цикл:

Бактерии размножаются посредством бинарного деления – формы бесполого размножения. В идеальных лабораторных условиях клетки штамма *E. coli* K-12 способны делиться каждые 20 минут. В природных условиях на это уходит около 15 часов (Gibson B, Wilson DJ, Feil E, Eyre-Walker A. The distribution of bacterial doubling times in the wild. Proc Biol Sci. 2018;285(1880):20180789. doi:10.1098/rspb.2018.0789).

информация о выживаемости в окружающей среде, включая сезонность и способность образовывать структуры, необходимые для выживания (споры, склероции и другое):

В окружающей среде (вне стерильных лабораторных условий) клетки *E. coli* K-12 выживают не дольше 30 дней, т.к. не способны конкурировать с местной микробиотой.

(van Elsas JD, Semenov AV, Costa R, Trevors JT. Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects [published correction appears in ISME J. 2011 Feb;5(2):367]. ISME J. 2011;5(2):173-183. doi:10.1038/ismej.2010.80)

(Søren Johannes Sørensen, Survival of Escherichia coli K12 in seawater, FEMS Microbiology Letters, Volume 85, Issue 2, April 1991, Pages 161–167, https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04708.x-i1)

(Bogosian G, Sammons LE, Morris PJ, O'Neil JP, Heitkamp MA, Weber DB. Death of the Escherichia coli K-12 strain W3110 in soil and water. Appl Environ Microbiol. 1996;62(11):4114-4120. doi:10.1128/aem.62.11.4114-4120.1996)

Бактерии *E. coli* не образуют споры, однако могут переходить в жизнеспособное, но некультивируемое состояние (VBNC). Такие изменённые клетки способны дольше персистировать в окружающей среде (Na, S.H., Miyanaga, K., Unno, H. et al. The survival response of Escherichia coli K12 in a natural environment. Appl Microbiol Biotechnol 72, 386–392 (2006). https://doi.org/10.1007/s00253-005-0268-3).

патогенность (инфекционная способность, токсиногенность, вирулентность, аллергенность, наличие векторов для переноса патогенов, возможные вектора, круг хозяев, возможная активация латентных вирусов (провирусов), способность колонизировать другие организмы):

Реципиентный штамм является непатогенным. Бактерии *E. coli* K-12 относятся к 1 группе риска (патогенности) по классификации Всемирной организации здравоохранения, т.к. не они не обладают полным комплексом липополисахаридов (т.е. не содержат О-антигена), не содержат активных факторов вирулентности (например, токсинов) или факторов колонизации и генов, кодирующих эти факторы.

устойчивость к антибиотикам, возможное использование этих антибиотиков для профилактики и терапии у людей и домашних животных:

Клетки штамма *Escherichia coli* ATCC 98082 чувствительны к ряду антибактериальных средств: амикацин, тигециклин, тобрамицин, цефепим, хлорамфеникол, пиперациллин + тазобактам, цефокситин, ампициллин, ампициллин + клавулановая кислота, цефотаксим, ципрофлоксацин, колистин, сульфаметоксазол, имипенцилмиксиновая кислота, эрметапениксазол, имипенцилметиновая кислота, трифтофосфат, трифтофосфат меропенем, азитромицин.

природа врожденных векторов (структура, частота мобилизации, специфичность, наличие генов устойчивости):

реципиентный штамм содержит природную низкокопийную (1-2 копии на хромосому) плазмиду, которая, возможно, способна к конъюгативному переносу, т.к. содержит предсказанный кластер *tra*-генов. Аннотированная последовательность нуклеотидов плазмиды доступна в базе данных ГенБанк (код доступа CP034659).

2. Биологические особенности вектора:

2.1. природа и происхождение вектора, естественная среда обитания и соответствующие характеристики безопасности:

В качестве вектора была использована синтетическая коммерческая плазмида pMW219 (Nippon Gene Co., Ltd.), которая создана для клонирования фрагментов ДНК в клетках *E. coli*. Данный вектор сконструирован из фрагментов ДНК космиды Lorist6, а также плазмид pBR322, pSC101 и pUC19 (https://www.nippongene.com/siyaku/product/dna-cloning/pmw218-219-dna/pmw219-dna.html). Аннотированная последовательность нуклеотидов плазмиды доступна в базе данных ГенБанк (код доступа AB005478).

2.2. структура транспозонов, промоторов и других некодирующих генетических сегментов, использованных для создания генетической конструкции, необходимых для ее переноса и функционирования в реципиентном организме:

для экспрессии внесённых дополнительных копий белок-кодирующих последовательностей используются только нативные промоторы амплифицированных генов.

2.3. частота мобилизации (способность приобретения мобильности) встроенного вектора или переноса в другие организмы:

плазмида pMW219 не является мобилизуемым вектором.

2.4. факторы, которые могут влиять на способность вектора адаптироваться в других организмах-хозяевах:

Распространение плазмид на основе pSC101 репликона, к которым относится pMW219, ограничено бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Но при встраивании мобильных генетических элементов или гомологичной рекомбинации плазмиды могут расширить круг хозяев из-за приобретения дополнительных генетических детерминант (Kok M, Rekik M, Witholt B,

Harayama S. Conversion of pBR322-based plasmids into broad-host-range vectors by using the Tn3 transposition mechanism. J Bacteriol. 1994;176(21):6566-6571. doi:10.1128/jb.176.21.6566-6571.1994).

3. Характеристика генно-инженерного организма:

3.1. информация, относящаяся к генно-инженерной модификации:

методы, использованные при создании, переносе трансгенной конструкции и отборе трансгенных организмов:

Для создания генно-инженерного вектора на основе плазмиды pMW219, были использованы методы амплификации целевых фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции и рестриктазно-лигазные методы создания рекомбинантных молекул ДНК.

Для внесения генетической информации в виде рекомбинантной плазмиды в реципиентный микроорганизм использовался метод трансформации. Отбор трансгенных бактерий на первом этапе осуществлялся на основании способности расти на питательных средах с канамицином, затем наличие целевой плазмиды подтверждали с помощью метода секвенирования ДНК.

Для внесения генетической информации в хромосому реципиентного микроорганизма использовалась система CRISPR / Cas9. При отборе трансгенных бактерий использовались методы полимеразной цепной реакции и секвенирования ДНК.

описание встроенного в геном реципиентного организма фрагмента ДНК, включая регуляторные и другие элементы, влияющие на функционирование трансгенов:

С помощью генно-инженерной плазмиды увеличено количество копий ряда генов прародительского штамма:

- *thrA* (кодирует бифункциональную аспартаткиназу / гомосериндегидрогеназу);
- *thrB* (кодирует гомосеринкиназу);
- *ppc* (кодирует фосфоенолпируваткарбоксилазу);
- *aspA* (кодирует аспартат-аммоний-лиазу);
- *pntA* (кодирует альфа-субъединицу Re / Si-специфической НАД(Ф)$^+$ трансгидрогеназы);
- *pntB* (кодирует бета-субъединицу Re / Si-специфической НАД(Ф)$^+$ трансгидрогеназы).

Перечисленные гены организованы в три оперона (*thrAB*, *ppc* и *aspA-pntAB*) под контролем нативных промоторов. Оперон *aspA-pntAB* также подпадает под контроль промотора *bla*-гена.

Добавлен ген из плазмиды pMW219, продукт которого сообщает трансгенному микроорганизму способность расти на средах с добавлением антибиотика канамицина:

- *aph* (кодирует аминогликозид-О-фосфотрансферазу).

В хромосому встроено два идентичных фрагмента ДНК, несущих гены:

- *thrA* (кодирует бифункциональную аспартаткиназу / гомосериндегидрогеназу);
- *thrB* (кодирует гомосеринкиназу);
- *thrC* (кодирует треонинсинтазу).

структура (сиквенс) и функциональное соответствие встроенного фрагмента ДНК, присутствие в нем известных потенциально опасных последовательностей:

потенциально опасные последовательности отсутствуют. Последовательность нуклеотидов генно-инженерной плазмиды:

```
   1 CTTGCGAGGG TGCTACtTAA GCCTTTAGGG TTTTAAGGTC TGTTTTGTAG AGGAGCAAAC AGCGTTTGCG ACATCCTTTT
  81 GTAATACTGC GGAACTGACT AAAGTAGTGA GTTATACACA GGGCTGGGAT CTATTCTTTT TATCTTTTTT TATTCTTTCT
 161 TTATTCTATA AATTATAACC ACTTGAATAT AAACAAAAAA AACACACAAA GGTCTAGCGG AATTTACAGA GGGTCTAGCA
 241 GAATTTACAA GTTTTCCAGC AAAGGTCTAG CAGAATTTAC AGATACCCAC AACTCAAAGG AAAAGGACTA GTAATTATCA
 321 TTGACTAGCC CATCTCAATT GGTATAGTGA TTAAAATCAC CTAGACCAAT TGAGATGTAT GTCTGAATTA GTTGTTTTCA
 401 AAGCAAATGA ACTAGCGATT AGTCGCTATG ACTTAACGGA GCATGAAACC AAGCTAATTT TATGCTGTGT GGCACTACTC
 481 AACCCCACGA TTGAAAACCC TACAAGGAAA GAACGGACGG TATCGTTCAC TTATAACCAA TACGCTCAGA TGATGAACAT
 561 CAGTAGGGAA AATGCTTATG GTGTATTAGC TAAAGCAACC AGAGAGCTGA TGACGAGAAC TGTGGAAATC AGGAATCCTT
 641 TGGTTAAAGG CTTTGAGATT TTCCAGTGGA CAAACTATGC CAAGTTCTCA AGCGAAAAAT TAGAATTAGT TTTTAGTGAA
 721 GAGATATTGC CTTATCTTTT CCAGTTAAAA AAATTCATAA AATATAATCT GGAACATGTT AAGTCTTTTG AAAACAAATA
 801 CTCTATGAGG ATTTATGAGT GGTTATTAAA AGAACTAACA CAAAAGAAAA CTCACAAGGC AAATATAGAG ATTAGCCTTG
 881 ATGAATTTAA GTTCATGTTA ATGCTTGAAA ATAACTACCA TGAGTTTAAA AGGCTTAACC AATGGGTTTT GAAACCAATA
 961 AGTAAAGATT TAAACACTTA CAGCAATATG AAATTGGTGG TTGATAAGCG AGGCCGCCCG ACTGATACGT TGATTTTCCA
1041 AGTTGAACTA GATAGACAAA TGGATCTCGT AACCGAACTT GAGAACAACC AGATAAAAAT GAATGGTGAC AAAATACCAA
1121 CAACCATTAC ATCAGATTCC TACCTACATA ACGGACTAAG AAAAACACTA CACGATGCTT TAACTGCAAA AATTCAGCTC
1201 ACCAGTTTTG AGGCAAAATT TTTGAGTGAC ATGCAAAGTA AGTATGATCT CAATGGTTCG TTCTCATGGC TCACGCAAAA
1281 ACAACGAACC ACACTAGAGA ACATACTGGC TAAATACGGA AGGATCTGAG GTTCTTATGG CTCTTGTATC TATCAGTGAA
1361 GCATCAAGAC TAACAAACAA AAGTAGAACA ACTGTTCACC GTTACATATC AAAGGGAAAA CTGTCCATAT GCACAGATGA
1441 AAACGGTGTa AAAAAGATAG ATACATCAGA GCTTTTACGA GTTTTTGGTG CATTCAAAGC TGTTCACCAT GAACAGATCG
1521 ACAATGTAAC AGATGAACAG CATGTAACAC CTAATAGAAC AGGTGAAACC AGTAAAACAA AGCAACTAGA ACATGAAATT
1601 GAACACCTGA GACAACTTGT TACAGCTCAA CAGTCACACA TAGACAGCCT GAAACAGGCG ATGCTGCTTA TCGAATCAAA
1681 GCTGCCGACA ACACGGGAGC CAGTGACGCC TCCCGTGGGG AAAAAATCAT GGCAATTCTG GAAGAAATAG CGCCATTCGC
1761 CATTCAGGCT GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA AgGGGGATGT
1841 GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA GGGTTTTCCC AGTCACGACG TTGTAAAACG ACGGCCAGTG AATTCGAGCT
1921 CGGTACCCAA TTCCGGCAGG TCGTGCGGAA AAAACAGCCC CTGATTTTTG CCCAACCCCT GGGTTACGGC TTGCGCAAAG
2001 CTGACCTGCT CGTTGTGATC TTTCAGATTG TAGAGTTTCA TTTAGTTTTC CAGTACTCGT GCGCCCGCCG TATCCAGCCG
2081 GCAAATATGA ACAAAACCTT CCTGATTTTG CAGGTAGTTC TTACCCAACC AGTCGGCAAC GCGCTGGGCG GTTTCCGGCT
2161 TGTCACACAG AGCGAACAAG GTCGGGCCGG AGCCGGAGAT ACCGCTCGCT ACCGCGCCGA TTTCCGCGAC CGCCTGCCGC
2241 GCCTGCCGGA AGCCTGGCAG TAACCGTTCA CGGTAGGGTT CAGCGATAAC ATCTTTCATC AGCTTCGCGG CAAGCTCAGG
2321 CTGACGGGAA TAGCAGGCGT GAATGAAGCC TGCCAGATGT CGCCCGTGCG CAATGCAATC CTGGCGGCGA TACTGCGCCG
2401 GTAAAATAGC CCTGGCTTCT GCCGTCGAGA CTTTAATCCC CGGATACGCC AGCACCCACA GCCACTCATC AAACCCTGGC
2481 ACTTGCTGGC TGATGATGTC GTTTTCTTCG ATCATCAACT GCATACCACC GAGAAAACAC GGTGCCACGT TGTCGTAATG
2561 AATGCTGCCG GAGATACGGC CTTCCAGCTC GCCCATCAAA GCCAGCAAAC GAGTGTCATT AAGCGGCTTG CCGCAGTGTT
2641 CATTCATCGC CATCAGCGCC GCGACCACCG AACAGGCACT GGAGCCTAAG CCCGAACCGA TCGGCATATT CTTTTCCAGG
2721 GTCATCGCCA CTGGAATTTG CTTACCCAGT TCCTGGCaAA AACGCTCCCA GCACTGATAA ACGATATTTT CCCGTGGTTC
2801 TGACGGCAGC TTATCGGCAA AGCGTCCGAG GTTGTTGAGA CTGAATGTCT CTGCCGCCTC AACCGTGACT ACATCTCCGA
2881 GCAATGCACC ATCAACAGGT GTCACCGCCG CCCCGAGCAC ATCAAACCCG ACGCTCATAT TGGCACTGGA AGCCGGGGCA
2961 TAAACTTTAA CCATGTCAGA CTCCTAACTT CCATGAGAGG GTACGTAGCA GATCAGCAAA GACACCGGCA GCTGTAACGT
3041 CATTGCCCGC ACCATATCCG CGCAGTACCA ACGGCAGCGG CTGATAATAG TGGCTATAGA AGGCCAGGGC GTTTTCGCCA
3121 TTTTTCACTT TGAACAGCGG ATCATTACCA TCCACTTCGG CAATCTTCAC GCGGCAGACG CCATCTTCAT CAATATTGCC
3201 AACATAGCGC AAAACTTTTC CTTCATCACG GGCCTTCGCC ACGCGCGCGG CAAAGAGATC GTCGAGTTGT GACAGATTCG
3281 CCATAAAAGC GGCAACATCA CCCTCGGCGT TAAACTCTGC GGGCAGCACA GGTTCAATTT CAATATCCGC CAGCTCCAGT
3361 TCACGTCCCG TTTCACGAGC GAGAATCAAT AGTTTACGCG CCACATCCAT ACCAGAAAGA TCATCTCGCG GGTCCGGTTC
3441 GGTATAACCC ATTTCCCGCG CCAGCGTGGT CGCCTCGGAG AAACTCATGC CTTCGTCTAA CTTGCCGAAG ATATAAGAAA
3521 GCGAACCAGA AAGAATGCCG GAGAACTTCA TCAATTCATC ACCTGCATTG AGCAGATTTT GCAGGTTCTC AATAACCGGT
3601 AATCCAGCCC CAACGTTGGT GTCATAGAGG AATTTACGCC GCGATTTTTC CGCCGCATAA CGCAACTGAT GGTAGTAATC
3681 CATCGACGAG GTGTTGGCCT TTTTGTTCGG CGTGACAACG TGGAAACCTT CGCGCAGGAA GTCGGCATAT TGATCCGCCA
3761 CTGCCTGGCT GGAAGTGCAG TCAACAATGA CCGGGTTCAG CAGATGATAT TCTTTCACGA GGCGaATTAA GCGCCCGAGA
3841 TTAAACGGCT CTTTGGCTTG CGCCAGTTCT TCCTGCCAGT TTTCCAGATT AAGGCCATGT ACATTGGTGA GCAGAGCCTT
3921 CGAGTTGGCA ACACCGCAGA CACGTAAGTC GATATGTTTA TTCTTCAGCC AGCTTTGCTG ACGCTTCAGT TGCTCCAGCA
4001 GCGCACCGCC AACGCCACCG ACGCCAATCA CAAACACTTC GATAACCTGA TCGGTATTGA ACAGCATCTG ATGAGTAACG
4081 CGCACGCCAG TGGTCGCATC ATCGTTATTT ACCACGACAG AGATTGAGCG TTCAGAAGAT CtCTGAGCAA TGGCGACAAT
4161 GTTGATATTG GCGCGGGCCA GTGCGGCAAA GAATTTCGCC GAGATCCCAC GCAAGGTGCG CATACCATCA CCTACCACCG
4241 AGATAATGGC CAGCCGTTCC GTCACTGCCA GCGGCTCCAG TAAGCCTTCT TTCAGTTCCA GGTAGAACTC TTCCTGCATT
4321 GCCCGTTCAG CTCGCACACA GTCGCTTTGT GGAACGCAGA AACTGATGCT GTATTCGGAA GATGATTGCG TAATCAGCAC
4401 CACGGAAATA CGGGCGCGTG ACATCGCTGC AAAGACGCGC GCCGCCATGC CGACCATCCC TTTCATCCCC GGACCAGAAA
4481 CGCTGAACAT TGCCATGTTA TTCAGATTGG AAATGCCCTT GACCGGTAAT TCGTCTTCAT CACGGCTGGC ACCAATGAGC
4561 GTACCTGGTG CTTGAGGATT TCCGGTATTT TTAATCAGGC AAGGGATCTG GAACTGGGCG ATGGGGGTAA TGGTGCGGGG
4641 GTGAAGAACT TTAGCGCCGA AGTAGGAAAG CTCCATCGCT TCCTGGTAGG ACATCGACTT CAACAACCTC GCATCGGGCA
4721 CCTGACGCGG GTCGCAGGTA TAGACCCCGT CAACGTCCGT CCAAATCTCG CAACAATCGG CGCGTAAACA GGCAGCCAGC
4801 ACCGCAGCAG AGTAGTCGGA ACCGTTGCGT CCAAGCACCA CCAGTTCGCC TTTTTCATTA CCGGCGGTGA AACCTGCCAT
4881 CAGCACCATG TGATCAGCCG GAATGCGGCT TGCCGCAATA CGGCGGGTGG ACTCAGCAAT ATCGACGGTA GATTCGAGGT
```

4961 AATGCCCCAC TGCCAGCAGT TTTTCGACCG GATCGATAAC AGTAACGTTG TGACCGCGCG CTTCTAATAC GCCGGCCATA
5041 ATGGCGATCG ACATTTTCTC GCCACGGCAA ATCAGCGCAG CGTTGATGCT ATCCGGGCAC TGCCCCAACA AACTAATGCC
5121 ATGCAGGACA TGTTTTATTT GGGCAAATTC CTGATCGACG AAAGTTTTCA ATTGCGCCAG CGGGAACCCC GGCTGGGCGG
5201 CGGCGAGTCC CGTCAAAAGT TCGGCAAAAA TACGTTCGGC ATCGCTGATA TTGGGTAAAG CATCCTGGCC GCTAATGGTT
5281 TTTTCAATCA TCGCCACCAG GTGGTTGGTG ATTTTGGCGG GGGCAGAGAG GACGGTGGCC ACCTGCCCCT GCCTGGCATT
5361 GCTTTCCAGA ATATCGGCAA CACGCAGAAA ACGTTCTGCA TTTGCCACTG ATGTACCGCC GAACTTCAAC ACTCGCATGG
5441 TTGTTACCTC GTTACCTTTG GTCGaaaAAA AAAGCCCGCA CTGTCAGGTG CGGGCTTTTT TCTGTGTTTC CTGTACGCGT
5521 CAGCCCGCAC CGTTACCTGT GGTAATGGTG ATGGTGGTGG TAATGGTGGT GCTAATGCGT TTCATGGATG TTGTGTACTC
5601 TGTAATTTTT ATCTGTCTGT GCGCTATGCC TATATTGGTT AAAGTATTTA GTGACCTAAG TCAATAAAAT TTTAATTTAC
5681 TCACGGCAGG TAACCAGTTC AGAAGCTGCT ATCAGACACT CTTTTTTTAA TCCACACAGA GACATATTGC CCGTTGCAGT
5761 CAGAATGAAA AGCTGAAAAA TACTTACTAA GGCGTTTTTT ATTTGGTGAT AtTTTTTTCA ATATCATGCA GCAAACGGTG
5841 CAACATTGCC GTGTCTCGTT GCTCTAAAAG CCCCAGGCGT TGTTGTAACC AGTCGACCAG TTTTATGTCA TCTGCCACTG
5921 CCAGAGTCGT CAGCAATGTC ATGGCTCGTT CGCGTAAAGC TGGGTCGACC GGTCGACCGG CGATTTTTTA ACATTTCCAT
6001 AAGTTACGCT TATTTAAAGC GTCGTGAATT TAATGACGTA AATTCCTGCT ATTTATTCGT TTGCTGAAGC GATTTCGCAG
6081 CATTTGACGT CACCGCTTTT ACGTGGCTTT ATAAAAGACG ACGAAAAGCA AAGCCCGAGC ATATTCGCGC CAATGCGACG
6161 TGAAGGATAC AGGGCTATCA AACGATAAGA TGGGGTGTCT GGGGTAATAT GAACGAACAA TATTCCGCAT TGCGTAGTAA
6241 TGTCAGTATG CTCGGCAAAG TGCTGGGAGA AACCATCAAG GATGCGTTGG GAGAACACAT TCTTGAACGC GTAGAAACTA
6321 TCCGTAAGTT GTCGAAATCT TCACGCGCTG GCAATGATGC TAACCGCCAG GAGTTGCTCA CCACCTTACA AAATTTGTCG
6401 AACGACGAGC TGCTGCCCGT TGCGCGTGCG TTTAGTCAGT TCCTGAACCT GGCCAACACC GCCGAGCAAT ACCACAGCAT
6481 TTCGCCGAAA GGCGAAGCTG CCAGCAACCC GGAAGTGATC GCCCGCACCC TGCGTAAACT GAAAAACCAG CCGGAACTGA
6561 GCGAAGACAC CATCAAAAAA GCAGTGGAAT CGCTGTCGCT GGAACTGGTC CTCACGGCTC ACCCAACCGA AATTACCCGT
6641 CGTACACTGA TCCACAAAAT GGTGGAAGTG AACGCCTGTT TAAAACAGCT CGATAACAAA GATATCGCTG ACTACGAACA
6721 CAACCAGCTG ATGCGTCGCC TGCGCCAGTT GATCGCCCAG TCATGGCATA CCGATGAAAT CCGTAAGCTG CGTCCAAGCC
6801 CGGTAGATGA AGCCAAATGG GGCTTTGCCG TAGTGGAAAA CAGCCTGTGG CAAGGCGTAC CAAATTACCT GCGCGAACTG
6881 AACGAACAAC TGGAAGAGAA CCTCGGCTAC AAACTGCCCG TCGAATTTGT TCCGGTCCGT TTTACTTCGT GGATGGGCGG
6961 CGACCGCGAC GGCAACCCGA ACGTCACTGC CGATATCACC CGCCACGTCC TGCTACTCAG CCGCTGGAAA GCCACCGATT
7041 TGTTCCTGAA AGATATTCAG GTGCTGGTTT CTGAACtGTC GATGGTTGAA GCGACCCCTG AACTGCTGGC GCTGGTTGGC
7121 GAAGAAGGTG CCGCAGAACC GTATCGCTAT CTGATGAAAA ACCTGCGTTC TCGCCTGATG GCGACACAGG CATGGCTGGA
7201 AGCGCGCCTG AAAGGCGAAG AACTGCCAAA ACCAGAAGGC CTGCTGACAC AAAACGAAGA ACTGTGGGAA CCGCTCTACG
7281 CTTGCTACCA GTCACTTCAG GCGTGTGGCA TGGGTATTAT CGCCAACGGC GATCTGCTCG ACACCCTGCG CCGCGTGAAA
7361 TGTTTCGGCG TACCGCTGGT CCGTATTGAT ATCCGTCAGG AGAGCACGCG TCATACCGAA GCGCTGGGCG AGCTGACCCG
7441 CTACCTCGGT ATCGGCGACT ACGAAAGCTG GTCAGAGGCC GACAAACAGG CGTTCCTGAT CCGCGAACTG AACTCCAAAC
7521 GTCCGCTTCT GCCGCGCAAC TGGCAACCAA GCGCCGAAAC GCGCGAAGTG CTCGATACCT GCCAGGTGAT TGCCGAAGCA
7601 CCGCAAGGCT CCATTGCCGC CTACGTGATC TCGATGGCGA AAACGCCGTC CGACGTACTG GCTGTCCACC TGCTGCTGAA
7681 AGAAGCGGGT ATCGGGTTTG CGATGCCGGT TGCTCCGCTG TTTGAAACCC TCGATGATCT GAACAACGCC AACGATGTCA
7761 TGACCCAGCT GCTCAATATT GACTGGTATC GTGGCCTGAT TCAGGGCAAA CAGATGGTGA TGATTGGCTA TTCCGACTCA
7841 GCAAAAGATG CGGGAGTGAT GGCAGCTTCC TGGGCGCAAT ATCAGGCACA GGATGCATTA ATCAAAACCT GCGAAAAAGC
7921 GGGTATTGAG CTGACGTTGT TCCACGGTCG CGGCGGTTCC ATTGGTCGCG GCGGCGCACC TGCTCATGCG GCGCTGCTGT
8001 CACAACCGCC AGGAAGCCTG AAAGGCGGCC TGCGCGTAAC CGAACAGGGC GAGATGATCC GCTTTAAATA TGGTCTGCCA
8081 GAAATCACCG TCAGCAGCCT GTCGCTTTAT ACCGGGGCGA TTCTGGAAGC CAACCTGCTG CCACCGCCGG AGCCGAAAGA
8161 GAGCTGGCGT CGCATTATGG ATGAACTGTC AGTCATCTCC TGCGATGTCT ACCGCGGCTA CGTACGTGAA AACAAAGATT
8241 TTGTGCCTTA CTTCCGCTCC GCTACGCCGG AACAAGAACT GGGCAAACTG CCGTTGGGTT CACGTCCGGC GAAACGTCGC
8321 CCAACCGGCG GCGTCGAGTC ACTACGCGCC ATTCCGTGGA TCTTCGCCTG GACGCAAAAC CGTCTGATGC TCCCCGCCTG
8401 GCTGGGTGCA GGTACGGCGC TGCaAAAAGT GGTCGAAGAC GGCAAACAGA GCGAGCTGGA GGCTATGTGC CGCGATTGGC
8481 CATTCTTCTC GACGCGTCTC GGCATGCTGG AGATGGTCTT CGCCAAAGCA GACCTGTGGC TGGCGGAATA CTATGACCAA
8561 CGCCTGGTAG ACAAAGCACT GTGGCCGTTA GGTAAAGAGT TACGCAACCT GCAAGAAGAA GACATCAAAG TGGTGCTGGC
8641 GATTGCCAAC GATTCCCATC TGATGGCCGA TCTGCCGTGG ATTGCAGAGT CTATTCAGCT ACGGAATATT TACACCGACC
8721 CGCTGAACGT ATTGCAGGCC GAGTTGCTGC ACCGCTCCcG CCAGGCAGAA AAAGAAGGCC AGGAACCGGA TCCTCGCGTC
8801 GAACAAGCGT TAATGGTCAC TATTGCCGGG ATTGCGGCAG GtatgcgtaA TACCGGCTAA TCTTCCTCTT CTGCAAACCC
8881 TCGTGCTTTT GCGCGAGGGT TTTCTGAAAT ACTTCTGTTC TAACACCCTC GTTTTCAATA TATTTCTGTC TGCATTTTAT
8961 TCAAATTCTG AATATACCTT CAGATATCCT TAAGGCCTCG TGATACGCCT ATTTTTATAG GTTAATGTCA TGATAATAAT
9041 GGTTTCTTAG ACGTCAGGTG GCACTTTTCG GGgAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT ATTTTTCTAA ATACATTCAA
9121 ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCCT GATAAATGCT TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGTATGAG TATTCAACAT
9201 TTCCGTGTCG CCCTTATTCC CTTTTTTGCG GCATTTTGCC TTCCTGTTTT TGCTCACCCA GAAACGCTGG TGAAAGTAAA
9281 AGATGCTGAA GATCAGTTGG GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG TAAGATCCTT GAGAGTTTTC
9361 GCCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTAAAGT TCTGCTATGT GGCGCGGTAT TATCCCGTAT TGACGCCGGG
9441 CAAGAGCAAC TCGGTCGCCG CATACACTAT TCTCAGAATG ACTTGGtTGA GTGGGGATCC TCTaGCGGTA CCCTGATCAG
9521 CGAAACACTT TTAATCATCT CCGCCGCTGG GTTTTCACCC GCCGCCAtTT TTTGCTGCAT CAGCACGAAA TTCTTAAAGC
9601 CCTGGTTACG TACCAGTGAC ATACCGATAA CTGACGTGAA TATAACCAGC ACGAGGGTCA GCAATACCCC CAATACATGG
9681 GCAACCTGAA TAAAGATTGA AATCTCAATA TAGACATAAA GGAAAATGGC AATaAAAGGT AACCAGCGCA AAGGTTTCTC
9761 CTGTAATAGC AGCCGGTTAA CCCCGGCTAC CTGAATGGGT TGCGAATCGC GTTTAGCTTA TATTGTGGTC ATTAGCAAAA
9841 TTTCAAGATG TTTGCGCAAC TATTTTTGGT AGTAATCCCA AAGCGGTGAT CTATTTCACA AATTAATAAT TAAGGGGTAA
9921 AAACCGACAC TTAAAGTGAT CCAGATTACG GTAGAAATCC TCAAGCAGCA TATGATCTCG GGTATTCGGT CGATGCAGGG
10001 GATAATCGTC GGTCGAAAAA CATTCGAAAC CACATATATT CTGTGTGTTT AAAGCAAATC ATTGGCAGCT TGAAAAAGAA
10081 GGTTCAcAtG TCAAACAACA TTCGTATCGA AGAAGATCTG TTGGGTACCA gGGAAGTTCC AGCTGATGCC TACTATGGTG
10161 TTCACACTCT GAGAGCGATT GAAAACTTCT ATATCAGCAA CAACAAAATC AGTGATATTC CTGAATTTGT TCGCGGTATG
10241 GTAATGGTTA AAAAAGCCGC AGCTATGGCA AACAAAGAGC TGCAAACCAT TCCTAAAaGT GTAGCGAATG CCATCATTGC
10321 CGCATGTGAT GAAGTCCTGA ACAACGGAAA ATGCATGGAT CAGTTCCCGG TAGACGTCTA CCAGGGCGGC GCAGGTACTT
10401 CCGTAAACAT GAACACCAAC GAAGTGCTGG CCAATATCGG TCTGGAACTG ATGGGTCACC AAAAAGGTGA ATATCAGTAC
10481 CTGAACCCGA ACGACCATGT TAACAAATGT CAGTCCACTA ACGACGCCTA CCCGACCGGT TTCCGTATCG CAGTTTACTC
10561 TTCCCTGATT AAGCTGGTAG ATGCGATTAA CCAACTGCGT GAAGGCTTTG AACGTAAAGC TGTCGAATTC CAGGACATCC
10641 TGAAAATGGG TCGTACCCAG CTGCAGGACG CAGTACCGAT GACCCTCGGT CAGGAATTCC GCGCTTTCAG CATCCTGCTG
10721 AAAGAAGAAG TGAAAAACAT CCAACGTACC GCTGAACTGC TGCTGGAAGT TAACCTTGGT GCAACGGCAA TCGGTACTGG
10801 TCTGAACACG CCGAAAGAGT ACTCTCCGCT GGCAGTGAAA AAACTGGCTG AAGTTACTGG CTTCCCATGC GTACCGGCTG
10881 AAGACCTGAT CGAAGCGACC TCTGACTGCG GCGCTTATGT TATGGTTCAC GGCGCGCTGA AACGCCTGGC TGTGAAGATG
10961 TCCAAAATCT GTAACGACCT GCGCTTGCTC TCTTCAGGCC CACGTGCCGG CCTGAACGAG ATCAACCTGC CGGAACTGCA
11041 GGCGGGCTCT TCCATCATGC CAGCTAAAGT AAACCCGGTT GTTCCGGAAG TGGTTAACCA GGTATGCTTC AAAGTCATCG
11121 GTAACGACAC CACTGTTACC ATGGCAGCAG AAGCAGGTCA GCTGCAGTTG AACGTTATGG AGCCGGTCAT TGGCCAGGCC
11201 ATGTTCGAAT CCGTTCACAT TCTGACCAAC GCTTGCTACA ACCTGCTGGA AAAATGCATT AACGGCATCA CTGCTAACAA

```
11281 AGAAGTGTGC GAAGGTTACG TTTACAACTC TATCGGTATC GTTACTTACC TGAACCCGTT CATCGGTCAC CACAACGGTG
11361 ACATCGTGGG TAAAATCTGT GCCGAAACCG GTAAGAGTGT ACGTGAAGTC GTTCTGGAAC GCGGTCTGTT GACTGAAGCG
11441 GAACTTGACG ATATTTTCTC CGTACAGAAT CTGATGCACC CGGCTTacaa agcaaaacgc tatactgatg aaagcgaaca
11521 gtaatcgtac agggtagtac aaataaaaaa ggcacgtcag atgacgtgcc ttttttcttg tgagcagtaa cttaagaata
11601 acaatctaat atcaacttgt taaaaaacaa ggaaggctaa tatgctagtt gtagaactca tcatagtttt gctgggggat
11681 cctctagggg gatccagatc ACAGGCATAA TTTTCAGTAC GTTATAGGGC GTTTGTTACT AATTTATTTT AACGGAGTAA
11761 CATTTAGCTC GTACATGAGC AGCTTGTGTG GCTCCTGACA CAGGCAAACC ATCATCAATA AAACCGATGG AAGGGAATAT
11841 CATGCGAATT GGCATACCAA GAGAACGGTT AACCAATGAA ACCCGTGTTG CAGCAACGCC AAAAACAGTG GAACAGCTGC
11921 TGAAACTGGG TTTTACCGTC GCGGTAGAGA GCGGCGCGGG TCAACTGGCA AGTTTTGACG ATAAAGCGTT TGTGCAAGCG
12001 GGCGCTGAAA TTGTAGAAGG GAATAGCGTC TGGCAGTCAG AGATCATTCT GAAGGTCAAT GCGCCGTTAG ATGATGAAAT
12081 TGCGTTACTG AATCCTGGGA CAACGCTGGT GAGTTTTATC TGGCCTGCGC AGAATCCGGA ATTAATGCAA AAACTTGCGG
12161 AACGTAACGT GACCGTGATG GCGATGGACT CTGTGCCGCG TATCTCACGC GCACAATCGC TGGACGCACT AAGCTCGATG
12241 GCGAACATCG CCGGTTATCG CGCCATTGTT GAAGCGGCAC ATGAATTTGG GCGCTTCTTT ACCGGGCAAA TTACTGCGGC
12321 CGGGAAAGTG CCACCGGCAA AAGTGATGGT GATTGGTGCG GGTGTTGCAG GTCTGGCCGC CATTGGCGCA GCAAACAGTC
12401 TCGGCGCGAT TGTGCGTGCA TTCGACACCC GCCCGGAAGT GAAAGAACAA GTTCAAAGTA TGGGCGCGGA ATTCCTCGAG
12481 CTGGATTTTA AAGAGGAAGC TGGCAGCGGC GATGGCTATG CCAAAGTGAT GTCGGACGCG TTCATCAAAG CGGAAATGGA
12561 ACTCTTTGCC GCCCAGGCAA AAGAGGTCGA TATCATTGTC ACCACCGCGC TTATTCCAGG CAAACCAGCG CCGAAGCTAA
12641 TTACCCGTGA AATGGTTGAC TCCATGAAGG CGGGCAGTGT GATTGTCGAC CTGGCAGCCC AAAACGGCGG CAACTGTGAA
12721 TACACCGTGC CGGGTGAAAT CTTCACTACG GAAAATGGTG TCAAAGTGAT TGGTTATACC GATCTTCCGG GCCGTCTGCC
12801 GACGCAATCC TCACAGCTTT ACGGCACAAA CCTCGTTAAT CTGCTGAAAC TGTTGTGCAA AGAGAAAGAC GGCAATATCA
12881 CTGTTGATTT TGATGATGTG GTGATTCGCG GCGTGACCGT GATCCGTGCG GGCGAAATTA CCTGGCCGGC ACCGCCGATT
12961 CAGGTATCAG CTCAGCCGCA GGCGGCACAA AAAGCGGCAC CGGAAGTGAA AACTGAGGAA AAATGTACCT GCTCACCGTG
13041 GCGTAAATAC GCGTTGATGG CGCTGGCAAT CATTCTTTTT GGCTGGATGG CAAGCGTTGC GCCGAAAGAA TTCCTTGGGC
13121 ACTTCACCGT TTTCGCGCTG GCCTGCGTTG TCGGTTATTA CGTGGTGTGG AATGTATCGC ACGCGCTGCA TACACCGTTG
13201 ATGTCGGTCA CCAACGCGAT TTCAGGGATT ATTGTTGTCG GAGCACTGTT GCAGATTGGC CAGGGCGGCT GGGTTAGCTT
13281 CCTTAGTTTT ATCGCGGTGC TTATAGCCAG CATTAATATT TTCGGTGGCT TCACCGTGAC TCAGCGCATG CTGAAAATGT
13361 TCCGCAAAAA TTAAGGGGTA ACATATGTCT GGAGGATTAG TTACAGCTGC ATACATTGTT GCCGCGATCC TGTTTATCTT
13441 CAGTCTGGCC GGTCTTTCGA AACATGAAAC GTCTCGCCAG GGTAACAACT TCGGTATCGC CGGGATGGCG ATTGCGTTAA
13521 TCGCAACCAT TTTTGGACCG GATACGGGTA ATGTTGGCTG GATCTTGCTG GCGATGGTCA TTGGTGGGGC AATTGGTATC
13601 CGTCTGGCGA AGAAAGTTGA AATGACCGAA ATGCCAGAAC TGGTGGCGAT CCTGCATAGC TTCGTGGGTC TGGCGGCAGT
13681 GCTGGTTGGC TTTAACAGCT ATCTGCATCA TGACGCGGGA ATGGCACCGA TTCTGGTCAA TATTCACCTG ACGGAAGTGT
13761 TCCTCGGTAT CTTCATCGGG GCGGTAACGT TCACGGGTTC GGTGGTGGCG TTCGGCAAAC TGTGTGGCAA GATTTCGTCT
13841 AAACCATTGA TGCTGCCAAA CCGTCACAAA ATGAACCTGG CGGCTCTGGT CGTTTCCTTC CTGCTGCTGA TTGTATTTGT
13921 TCGCACGGAC AGCGTCGGCC TGCAAGTGCT GGCATTGCTG ATAATGACCG CAATTGCGCT GGTATTCGGC TGGCATTTAG
14001 TCGCCTCCAT CGGTGGTGCA GATATGCCAG TGGTGGTGTC GATGCTGAAC TCGTACTCCG GCTGGGCGGC TGCGGCTGCG
14081 GGCTTTATGC TCAGCAACGA CCTGCTGATT GTGACCGGTG CGCTGGTCGG TTCTTCGGGG GCTATCCTTT CTTACATTAT
14161 GTGTAAGGCG ATGAACCGTT CCTTTATCAG CGTTATTGCG GGTGGTTTCG GCACCGACGG CTCTTCTACT GGCGATGATC
14241 AGGAAGTGGG TGAGCACCGC GAAATCACCG CAGAAGAGAC AGCGGAACTG CTGAAAAACT CCCATTCAGT GATCATTACT
14321 CCGGGGTACG GCATGGCAGT CGCGCAGGCG CAATATCCTG TCGCTGAAAT TACTGAGAAA TTGCGCGCTC GTGGTATTAA
14401 TGTGCGTTTC GGTATCCACC CGGTCGCGGG GCGTTTGCCT GGACATATGA ACGTATTGCT GGCTGAAGCA AAAGTACCGT
14481 ATGACATCGT GCTGGAAATG GACGAGATCA ATGATGACTT TGCTGATACC GATACCGTAC TGGTGATTGG TGCTAACGAT
14561 ACGGTTAACC CGGCGGCGCA GGATGATCCG AAGAGTCCGA TTGCTGGTAT GCCTGTGCTG GAAGTGTGGA AAGCGCAGAA
14641 CGTGATTGTC TTTAAACGTT CGATGAACAC TGGCTATGCT GGTGTGCAAA ACCCGCTGTT CTTCAAGGAA AACACCCACA
14721 TGCTGTTTGG TGACGCCAAA GCCAGCGTGG ATGCAATCCT GAAAGCTCTG TAACCCTGAC GGCCTCTGCT GAGGCCGTCA
14801 CTCTTTATTG AGAAAGCTGG GGATCCTCTA GAGTCGACCT GCAGGCATGC AAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT
14881 TCCTGTGTGA AATTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT
14961 AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TGCGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT
15041 TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTTGCGTA TTGGGCGCTT TCTCATAGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT
15121 TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACC AACCAATTAA CCAATTCTGA TTAGAAAAAC TCATCGAGCA
15201 TCAAATGAAA CTGCAATTTA TTCATATCAG GATTATCAAT ACCATATTTT TGAAAAAGCC GTTTCTGTAA TGAAGGAGAA
15281 AACTCACCGA GGCAGTTCCA TAGGATGGCA AGATCCTGGT ATCGGTCTGC GATTCCGACT CGTCCAACAT CAATACAACC
15361 TATTAATTTC CCCTCGTCAA AAATAAGGTT ATCAAGTGAG AAATCACCAT GAGTGACGAC TGAATCCGGT GAGAATGGCA
15441 AAAGCTTATG CATTTCTTTC CAGACTTGTT CAACAGGCCA GCCATTACGC TCGTCATCAA AATCACTCGC ATCAACCAAA
15521 CCGTTATTCA TTCGTGATTG CGCCTGAGCG AGACGAAATA CGCGATCGCT GTTAAAAGGA CAATTACAAA CAGGAATCGA
15601 ATGCAACCGG CGCAGGAACA CTGCCAGCGC ATCAACAATA TTTTCACCTG AATCAGGATA TTCTTCTAAT ACCTGGAATG
15681 CTGTTTTCCC GGGGATCGCA GTGGTGAGTA ACCATGCATC ATCAGGAGTA CGGATAAAAT GCTTGATGGT CGGAAGgGGC
15761 ATAAATTCCG TCAGCCAGTT TAGTCTGACC ATCTCATCTG TAACATCATT GGCAACGCTA CCTTTGCCAT GTTTCAGAAA
15841 CAACTCTGGC GCATCGGGCT TCCCATACAA TCGATAGATT GTCGCACCTG ATTGCCCGAC ATTATCGCGA GCCCATTTAT
15921 ACCCATATAA ATCAGCATCC ATGTTGGAAT TTAATCGCGG CCTCGAGCAA GACGTTTCCC GTTGAATATG GCTCATAACA
16001 CCCCTTGTAT TACTGTTTAT GTAAGCAGAC AGTTTTATTG TTCATGATGA TATATTTTTA TCTTGTGCAA TGTAACATCA
16081 GAGATTTTGA GACACAACGT GGCTTTCCCC CCCCCCCCTG CAGGGCCTTT CGTCTTCAAG AATTGACAGT AAGACGGGTA
16161 AGCCTGTTGA TGATACCGCT GCCTTACTGG GTGCATTAGC CAGTCTGAAT GACCTGTCAC GGGATAATCC GAAGTGGTCA
16241 GACTGGAAAA TCAGAGGGCA GGAACTGCTG AACAGCAAAA AGTCAGATAG CACCACATAG CAGACCCGCC ATAAAACGCC
16321 CTGAGAAGCC CGTGACGGGC TTTTCTTGTA TTATGGGTAG TTTCCTTGCA TGAATCCATA AAAGGCGCCT GTAGTGCCAT
16401 TTACCCCCAT TCACTGCCAG AGCCGTGAGC GCAGCGAACT GAATGTCACG AAAAAGACAG CGACTCAGGT GCCTGATGGT
16481 CGGAGACAAA AGGAATATTC AGCGATTTGC CCGAG
```

Последовательность нуклеотидов встроенных в хромосому фрагментов ДНК:

```
  1 CTTTACGCGA ACGAGCCATG ACATTGCTGA CGACTCTGGC AGTGGCAGAT GACATAAAAC TGGTCGACTG GTTACAACAA
 81 CGCCTGGGGC TTTTAGAGCA ACGAGACACG GCAATGTTGC ACCGTTTGCT GCATGATATT GAAAAAAATA TCACCAAATA
161 AAAAACGCCT TAGTAAGTAT TTTTCAGCTT TTCATTCTGA CTGCAACGGG CAATATGTCT CTGTGTGGAT TAAAAAAAGA
241 GTGTCTGATA GCAGCTTCTG AACTGGTTAC CTGCCGTGAG TAAATTAAAA TTTTATTGAC TTAGGTCACT AAATACTTTA
321 ACCAATATAG GCATAGCGCA CAGACAGATA AAGACTCTAG AGTCCGACCA AAGGTAACGA GGTAACAACC ATGCGAGTGT
401 TGAAGTTCGG CGGTACATCA GTGGCAAATG CAGAACGTTT TCTGCGTGTT GCCGATATTC TGGAAAGCAA TGCCAGGCAG
481 GGGCAGGTGG CCACCGTCCT CTCTGCCCCC GCCAAAATCA CCAACCACCT GGTGGCGATG ATTGAAAAAA CCATTAGCGG
561 CCAGGATGCT TTACCCAATA TCAGCGATGC CGAACGTATT TTTGCCGAAC TTTTGACGGG ACTCGCCGCC GCCCAGCCGG
```

```
 641 GGTTCCCGCT GGCGCAATTG AAAACTTTCG TCGATCAGGA ATTTGCCCAA ATAAAACATG TCCTGCATGG CATTAGTTTG
 721 TTGGGGCAGT GCCCGGATAG CATCAACGCT GCGCTGATTT GCCGTGGCGA GAAAATGTCG ATCGCCATTA TGGCCGGCGT
 801 ATTAGAAGCG CGCGGTCACA ACGTTACTGT TATCGATCCG GTCGAAAAAC TGCTGGCAGT GGGGCATTAC CTCGAATCTA
 881 CCGTCGATAT TGCTGAGTCC ACCCGCCGTA TTGCGGCAAG CCGCATTCCG GCTGATCACA TGGTGCTGAT GGCAGGTTTC
 961 ACCGCCGGTA ATGAAAAAGG CGAACTGGTG GTGCTTGGAC GCAACGGTTC CGACTACTCT GCTGCGGTGC TGGCTGCCTG
1041 TTTACGCGCC GATTGTTGCG AGATTTGGAC GGACGTTGAC GGGGTCTATA CCTGCGACCC GCGTCAGGTG CCCGATGCGA
1121 GGTTGTTGAA GTCGATGTCC TACCAGGAAG CGATGGAGCT TTCCTACTTC GGCGCTAAAG TTCTTCACCC CCGCACCATT
1201 ACCCCCATCG CCCAGTTCCA GATCCCTTGC CTGATTAAAA ATACCGGAAA TCCTCAAGCA CCAGGTACGC TCATTGGTGC
1281 CAGCCGTGAT GAAGACGAAT TACCGGTCAA GGGCATTTCC AATCTGAATA ACATGGCAAT GTTCAGCGTT TCTGGTCCGG
1361 GGATGAAAGG GATGGTCGGC ATGGCGGCGC GCGTCTTTGC AGCGATGTCA CGCGCCCGTA TTTCCGTGGT GCTGATTACG
1441 CAATCATCTT CCGAATACAG CATCAGTTTC TGCGTTCCAC AAAGCGACTG TGTGCGAGCT GAACGGGCAA TGCAGGAAGA
1521 GTTCTACCTG GAACTGAAAG AAGGCTTACT GGAGCCGCTG GCAGTGACGG AACGGCTGGC CATTATCTCG GTGGTAGGTG
1601 ATGGTATGCG CACCTTGCGT GGGATCTCGG CGAAATTCTT TGCCGCACTG GCCCGCGCCA ATATCAACAT TGTCGCCATT
1681 GCTCAGAGAT CTTCTGAACG CTCAATCTCT GTCGTGGTAA ATAACGATGA TGCGACCACT GGCGTGCGCG TTACTCATCA
1761 GATGCTGTTC AATACCGATC AGGTTATCGA AGTGTTTGTG ATTGGCGTCG GTGGCGTTGG CGGTGCGCTG CTGGAGCAAC
1841 TGAAGCGTCA GCAAAGCTGG CTGAAGAATA AACATATCGA CTTACGTGTC TGCGGTGTTG CCAACTCGAA GGCTCTGCTC
1921 ACCAATGTAC ATGGCCTTAA TCTGGAAAAC TGGCAGGAAG AACTGGCGCA AGCCAAAGAG CCGTTTAATC TCGGGCGCTT
2001 AATTCGCCTC GTGAAAGAAT ATCATCTGCT GAACCCGGTC ATTGTTGACT GCACTTCCAG CCAGGCAGTG GCGGATCAAT
2081 ATGCCGACTT CCTGCGCGAA GGTTTCCACG TTGTCACGCC GAACAAAAAG GCCAACACCT CGTCGATGGA TTACTACCAT
2161 CAGTTGCGTT ATGCGGCGGA AAAATCGCGG CGTAAATTCC TCTATGACAC CAACGTTGGG GCTGGATTAC CGGTTATTGA
2241 GAACCTGCAA AATCTGCTCA ATGCAGGTGA TGAATTGATG AAGTTCTCCG GCATTCTTTC TGGTTCGCTT TCTTATATCT
2321 TCGGCAAGTT AGACGAAGGC ATGAGTTTCT CCGAGGCGAC CACGCTGGCG CGGGAAATGG GTTATACCGA ACCGGACCCG
2401 CGAGATGATC TTTCTGGTAT GGATGTGGCG CGTAAACTAT TGATTCTCGC TCGTGAAACG GGACGTGAAC TGGAGCTGGC
2481 GGATATTGAA ATTGAACCTG TGCTGCCCGC AGAGTTTAAC GCCGAGGGTG ATGTTGCCGC TTTTATGGCG AATCTGTCAC
2561 AACTCGACGA TCTCTTTGCC GCGCGCGTGG CGAAGGCCCG TGATGAAGGA AAAGTTTTGC GCTATGTTGG CAATATTGAT
2641 GAAGATGGCG TCTGCCGCGT GAAGATTGCC GAAGTGGATG GTAATGATCC GCTGTTCAAA GTGAAAAATG GCGAAAACGC
2721 CCTGGCCTTC TATAGCCACT ATTATCAGCC GCTGCCGTTG GTACTGCGCG GATATGGTGC GGGCAATGAC GTTACAGCTG
2801 CCGGTGTCTT TGCTGATCTG CTACGTACCC TCTCATGGAA GTTAGGAGTC TGACATGGTT AAAGTTTATG CCCCGGCTTC
2881 CAGTGCCAAT ATGAGCGTCG GGTTTGATGT GCTCGGGGCG GCGGTGACAC CTGTTGATGG TGCATTGCTC GGAGATGTAG
2961 TCACGGTTGA GGCGGCAGAG ACATTCAGTC TCAACAACCT CGGACGCTTT GCCGATAAGC TGCCGTCAGA ACCACGGGAA
3041 AATATCGTTT ATCAGTGCTG GGAGCGTTTT TGCCAGGAAC TGGGTAAGCA AATTCCAGTG GCGATGACCC TGGAAAAGAA
3121 TATGCCGATC GGTTCGGGCT TAGGCTCCAG TGCCTGTTCG GTGGTCGCGG CGCTGATGGC GATGAATGAA CACTGCGGCA
3201 AGCCGCTTAA TGACACTCGT TTGCTGGCTT TGATGGGCGA GCTGGAAGGC CGTATCTCCG GCAGCATTCA TTACGACAAC
3281 GTGGCACCGT GTTTTCTCGG TGGTATGCAG TTGATGATCG AAGAAAACGA CATCATCAGC CAGCAAGTGC CAGGGTTTGA
3361 TGAGTGGCTG TGGGTGCTGG CGTATCCGGG GATTAAAGTC TCGACGGCAG AAGCCAGGGC TATTTTACCG GCGCAGTATC
3441 GCCGCCAGGA TTGCATTGCG CACGGGCGAC ATCTGGCAGG CTTCATTCAC GCCTGCTATT CCCGTCAGCC TGAGCTTGCC
3521 GCGAAGCTGA TGAAAGATGT TATCGCTGAA CCCTACCGTG AACGGTTACT GCCAGGCTTC CGGCAGGCGC GGCAGGCGGT
3601 CGCGGAAATC GGCGCGGTAG CGAGCGGTAT CTCCGGCTCC GGCCCGACCT TGTTCGCTCT GTGTGACAAG CCGGAAACCG
3681 CCCAGCGCGT TGCCGACTGG TTGGGTAAGA ACTACCTGCA AAATCAGGAA GGTTTTGTTC ATATTTGCCG GCTGGATACG
3761 GCGGGCGCAC GAGTACTGGA AAACTAAATG AAACTCTACA ATCTGAAAGA TCACAACGAG CAGGTCAGCT TTGCGCAAGC
3841 CGTAACCCAG GGGTTGGGCA AAAATCAGGG GCTGTTTTTT CCGCACGACC TGCCGGAATT CAGCCTGACT GAAATTGATG
3921 AGATGCTGAA GCTGGATTTT GTCACCCGCA GTGCGAAGAT CCTCTCGGCG TTTATTGGTG ATGAAATCCC ACAGGAAATC
4001 CTGGAAGAGC GCGTGCGCGC GGCGTTTGCC TTCCCGGCTC CGGTCGCCAA TGTTGAAAGC GATGTCGGTT GTCTGGAATT
4081 GTTCCACGGG CCAACGCTGG CATTTAAAGA TTTCGGCGGT CGCTTTATGG CACAAATGCT GACCCATATT GCGGGTGATA
4161 AGCCAGTGAC CATTCTGACC GCGACCTCCG GTGATACCGG AGCGGCAGTG GCTCATGCTT TCTACGGTTT ACCGAATGTG
4241 AAAGTGGTTA TCCTCTATCC ACGAGGCAAA ATCAGTCCAC TGCAAGAAAA ACTGTTCTGT ACATTGGGCG GCAATATCGA
4321 AACTGTTGCC ATCGACGGCG ATTTCGATGC CTGTCAGGCG CTGGTGAAGC AGGCGTTTGA TGATGAAGAA CTGAAAGTGG
4401 CGCTAGGGTT AAACTCGGCT AACTCGATTA ACATCAGCCG TTTGCTGGCG CAGATTTGCT ACTACTTTGA AGCTGTTGCG
4481 CAGCTGCCGC AGGAGACGCG CAACCAGCTG GTTGTCTCGG TGCCAAGCGG AAACTTCGGC GATTTGACGG CGGGTCTGCT
4561 GGCGAAGTCA CTCGGTCTGC CGGTGAAACG TTTTATTGCT GCGACCAACG TGAACGATAC CGTGCCACGT TTCCTGCACG
4641 ACGGTCAGTG GTCACCCAAA GCGACTCAGG CGACGTTATC CAACGCGATG GACGTGAGTC AGCCGAACAA CTGGCCGCGT
4721 GTGGAAGAGT TGTTCCGCCG CAAAATCTGG CAACTGAAAG AGCTGGGTTA TGCAGCCGTG GATGATGAAA CCACGCAACA
4801 GACAATGCGT GAGTTAAAAG AACTGGGCTA CACTTCGGAG CCGCACGCTG CCGTAGCTTA TCGTGCGCTG CGTGATCAGT
4881 TGAATCCAGG CGAATATGGC TTGTTCCTCG GCACCGCGCA TCCGGCGAAA TTTAAAGAGA GCGTGGAAGC GATTCTCGGT
4961 GAAACGTTGG ATCTGCCAAA AGAGCTGGCA GAACGTGCTG ATTTACCCTT GCTTTCACAT AATCTGCCCG CCGATTTTGC
5041 TGCGTTGCGT AAATTGATGA TGAATCATCA GTAAAATCTA TTCATTATCT CAATCAGGCC GGGTTTGCTT TTATGCAGCC
5121 CGGCTTTTTT ATGAAGAAAT TATGGAGAAA AATGACAGGG AAAAAGGAGA AATTCTCAAT AAATGCGGTA ACTTAGAGAT
5201 TAGGATTGCG GAGAATAACA ACCGCCGTTC TCATCGAGTA ATCTCCGGAT ATCGACCCAT AACGGGCAAT GATAAAAGGA
5281 GTAACCTGTG AAAAAGATGC AATCTATCGT ACTCGCACTT TCCCTGGTTC TGGTCGCTCC CATGGCAGCA CAGGCTGCGG
5361 AAATTACGTT AGTCCCGTCA GTAAAATTAC AGATAGGCGA TCGTGATAAT CGTGGCTATT ACTGGGATGG AGGTCACTGG
5441 CGCGACCACG GCTGGTGGAA ACAACATTAT GAATGGCGAG GCAATCGCTG GCACCTACAC GGACCGCCGC CACCGCCGCG
5521 CCACCATAAG AAAGCTCCTC ATGATCATCA CGGCGGTCAT GGTCCAGGCA AACATCACCG CTAAATGACA AATGCCGGGT
5601 AACAATCCGG CATTCAGCGC CTGATGCGAC GCTGGCGCGT CTTATCAGGC CTACGTTAAT TCTGCAATAT ATTGAATCTG
5681 CATGCTTTTG TAGGCAGGAT AAGGCGTTCA CGCCGCATCC GGCATTGACT GCAAACTTAA CGCTGCTCGT AGCGTTTAAA
5761 CACCAGTTCG CCATTGCTGG AGGAATCTTC ATCAAAGAAG TAACCTTCGC TATTAAAACC AGTCAGTTGC TCTGGTTTGG
5841 TCAGCCGATT TTCAATAATG AAACGACTCA TCAGACCGCG TGCTTTCTTA GCGTAGAAGC TGATGATCTT AAATTTGCCG
5921 TTCTTCTCAT CGAGGAACAC CGGCTTGATA ATCTCGGCAT TCAATTTCTT CGGCTTCACC GATTTAAAAT ACTCATCTGA
6001 CGCCAGATTA ATCACCACAT TATCGCCTTG TGCTGCGAGC GCCTCGTTCA GCTTGTTGGT GATGATATCT CCCCAGAATT
6081 GATACAGATC TTTCCCTCGG GCATTCTCAA G
```

наличие во встроенной ДНК каких-либо неизвестных последовательностей и информация о том, в какой степени вставка ограничена ДНК, необходимой для осуществления предполагаемой функции:

все последовательности известны и содержат только гены, необходимые для осуществления запланированных функций.

характеристика сайта модификации реципиентного генома, локализация вставки;

вставки локализованы в пределах следующих локусов генома штамма *Escherichia coli* ATCC 98082 (номера доступа в ГенБанке CP034658):

- EKH78_10120;
- EKH78_19555.

стабильность инкорпорации привнесенной ДНК в геном реципиентного организма:

исследования не проводились.

описание методики обнаружения и идентификации встроенного фрагмента ДНК, чувствительность, надежность и специфичность этой методики:

встроенные фрагменты ДНК могут быть идентифицированы со 100% надёжностью и специфичностью с помощью полногеномного секвенирования трансгенного микроорганизма.

3.2. информация о генно-инженерном организме:

описание генетических признаков или фенотипических характеристик, в особенности новых признаков и характеристик, которые стали проявляться или перестали проявляться у генно-инженерных организмов по сравнению с реципиентными организмами:

фенотипические признаки (новые по сравнению с родительским штаммом):

1. повышенный синтез и накопление аминокислоты L-треонина;
2. повышенная устойчивость к канамицину;
3. более медленный рост в схожих условиях.

генетическая стабильность генно-инженерных организмов:

геном генно-инженерного штамма *E. coli* JUTH1801 стабилен на уровне исходного штамма *E. coli* ATCC 98082.

степень и уровень экспрессии трансгена(ов), метод оценки экспрессии трансгена(ов), его чувствительность:

анализ уровня экспрессии трансгенов не проводился.

активность и свойства протеина(ов), кодируемого трансгеном(ами):

трансгены кодируют ключевые ферменты, участвующие в биохимическом пути синтеза треонина (ThrA, ThrB, ThrC, Ppc, AspA, PntA и PntB) под контролем нативных промоторов, а также аминогликозид-О-фосфотрансферазу (Aph).

история прежних генно-инженерных модификаций генно-инженерных организмов:

отсутствует.

3.3. характеристика генно-инженерных организмов в связи с безопасностью для здоровья человека:

токсические или аллергенные эффекты генно-инженерных организмов и (или) продуктов их метаболизма:

не выявлены (приложение: заключение токсиколого-гигиенической экспертизы РУП «Научно-практический центр гигиены»).

риски возможных вредных воздействий на здоровье человека, связанные с использованием продуктов, полученных из генно-инженерных организмов:

отсутствуют.

способность генно-инженерных организмов к колонизации:

у аналогичных трансгенных штаммов отсутствует способность к колонизации кишечника людей и мышей (Levy SB, Marshall B, Rowse-Eagle D, Onderdonk A. Survival of Escherichia coli host-vector systems in the mammalian intestine. Science. 1980 Jul 18;209(4454):391-4. doi: 10.1126/science.6992276. PMID: 6992276.).

патогенность генно-инженерных организмов для иммунокомпетентного человеческого организма:

штамм является непатогенным для человека и животных (приложение: заключение о непатогенности штамма).

4. Информация о потенциальной принимающей среде:

4.1. местоположение участка, где будет осуществляться высвобождение (область, район, населенный пункт, принадлежность земельного участка землевладельцу или землепользователю с его полным наименованием):

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено; работа со штаммом будет осуществляться в замкнутой системе биореакторов и сопутствующего технологического оборудования, расположенных на заводе по производству кормовых аминокислот ЗАО «БНБК» (Адрес производства – Минская область, Пуховичский район, Дукорский с/с, 27).

4.2. физическая и биологическая близость к человеку и (или) какой-либо другой значительной биоте:

работа со штаммом будет осуществляться в замкнутой системе без контакта с другими биологическими объектами.

4.3. близость к заповедникам, заказникам и другим природоохраняемым объектам и территориям, расстояние участка от мест водозабора (питьевой воды):

Работа со штаммом в замкнутой системе будет осуществляться на участке, который частично расположен на территориях, подлежащих специальной охране: на расстоянии 1 км от водоохранной зоны канала Дричинский.

Источником водоснабжения предприятия являются подземные воды водозабора «Бор»; зона водозаборных сооружений водозабора «Бор» располагается в юго-западном направлении на расстоянии ~12,0 км от территории основной площадки ЗАО «БНБК».

4.4. численность населения в районе высвобождения и деятельность населения, экономически связанная с использованием природных ресурсов местности:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.5. описание участка, включающее его размер и обработанность, климатическую, геологическую и агрохимическую характеристики:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.6. флора и фауна, включая домашних животных, мигрирующие виды и возделываемые сельскохозяйственные культуры:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.7. описание экосистем, организмов-мишеней и организмов, не являющихся продуктами трансгенов, которые могут быть затронуты в результате высвобождения генно-инженерных организмов:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.8. сравнение мест естественного обитания реципиентных организмов с предполагаемым местом высвобождения генно-инженерных организмов;

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено.

4.9. методы вмешательства в природу участка (методы культивации, ирригации и другие):

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено.

5. Информация о взаимодействии генно-инженерных организмов с окружающей средой:

5.1. биологические особенности генно-инженерных организмов (по сравнению с интактными реципиентными организмами), которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение и распространение в потенциальной принимающей среде:

отсутствуют.

5.2. известные и прогнозируемые условия потенциальной принимающей среды, которые могут оказывать влияние на выживаемость, размножение, рассеивание генно-инженерных организмов:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено. После культивирования микроорганизма в замкнутой системе вся биомасса и реактор будет подвергаться обеззараживанию.

5.3. чувствительность или устойчивость к специфическим агентам:

по сравнению с реципиентным штаммом увеличена устойчивость к антибиотику канамицину.

5.4. характеристика и поведение генно-инженерных организмов, и их экологические воздействия в условиях, симулирующих естественную среду (теплица, ростовая комната):

характеристики трансгенных и реципиентных штаммов не отличаются;

5.5. способность к переносу генетической информации: вероятность переноса трансгенов от генно-инженерных организмов к организмам, населяющим потенциальную принимающую среду обитания, либо от этих организмов к генно-инженерным организмам:

способность к переносу генетической информации отсутствует, т.к. культивирование трансгенных микроорганизмов будет осуществляться в замкнутой системе без контакта с другими биологическими объектами.

5.6. вероятность проявления у генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде непредвиденных и (или) нежелательных свойств, признаков:

на уровне природных бактерий.

5.7. пути рассеивания генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде, известные или потенциальные способы взаимодействия с рассеивающими агентами, включая вдыхание, заглатывание, поверхностный контакт, проникновение в поры и другое:

отсутствуют.

5.8. вероятность резкого увеличения численности популяции генно-инженерных организмов в потенциальной принимающей среде:

культивирование в замкнутой системе сопровождается прогнозируемым накоплением биомассы бактерий, которая затем подвергается обеззараживанию.

5.9. конкурентное преимущество генно-инженерных организмов по сравнению с интактными реципиентными организмами:

способность расти на питательных средах с добавлением канамицина.

5.10. идентификация и описание организмов – мишеней продуктов трансгенов:

организмы-мишени отсутствуют.

5.11. предполагаемые механизм и результат взаимодействия генно-инженерных организмов с организмами-мишенями:

организмы-мишени отсутствуют.

5.12. идентификация и описание организмов, не являющихся мишенями продуктов трансгенов, которые могут быть подвержены влиянию генно-инженерных организмов:

организмы отсутствуют.

5.13. вероятность сдвига в характере взаимоотношений генно-инженерных организмов с другими организмами, изменения круга хозяев:

отсутствует.

5.14. известное или предполагаемое вовлечение генно-инженерных организмов в биогеохимические процессы:

отсутствует.

5.15. другие потенциально возможные взаимодействия генно-инженерных организмов с окружающей средой:

отсутствуют.

6. Информация об осуществлении высвобождения, о мониторинге, контроле, очистке территории и действиях при непредвиденных обстоятельствах:

6.1. информация о высвобождении генно-инженерных организмов:

описание предполагаемого высвобождения генно-инженерных организмов, его цели:

высвобождение генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 в окружающую среду не предусмотрено. Культивирование трансгенных микроорганизмов будет осуществляться в замкнутой системе с целью производства кормовой добавки «L-треонин 98,5%». Работа с генно-инженерным организмом будет осуществляться в соответствии с Постановлениями Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь «О порядке работы с непатогенными генно-инженерными организмами» от 31.05.2019 №12 и «О требованиях безопасности к замкнутым системам при осуществлении работ первого уровня риска генно-инженерной деятельности» от 17.08.2006 №50.

предполагаемые сроки начала и окончания высвобождения и календарный план экспериментов, связанных с высвобождением, включая количество и продолжительность экспериментов:

не предусмотрены.

предполагаемое количество высвобождаемых генно-инженерных организмов:

0.

метод высвобождения генно-инженерных организмов:

не предусмотрен.

подготовка участка к высвобождению:
не предусмотрена.

меры по защите сотрудников во время высвобождения:
не предусмотрены.

обработка участка после высвобождения:
не предусмотрена.

информация о наличии и результатах предыдущих высвобождений генно-инженерных организмов в окружающую среду:

отсутствует, поскольку генно-инженерный штамм *Escherichia coli* JUTH1801 предназначен для использования в замкнутой системе и его высвобождение в окружающую среду не предусмотрено.

6.2. методы мониторинга:

методы наблюдения за генно-инженерными организмами, мониторинга их взаимодействий с окружающей средой:

на производстве ЗАО «БНБК» будет осуществляться полный контроль за состоянием, перемещением, утилизацией генно-инженерного штамма *Escherichia coli* JUTH1801 с составлением отчетности по установленным формам и стандартам, принятым на предприятиях с соответствующим видом деятельности (приложение: Инструкция по осуществлению производственного контроля в области безопасности генно-инженерной деятельности ЗАО «БНБК», Инструкция о порядке обезвреживания непатогенных генно-инженерных штаммов микроорганизмов ЗАО «БНБК»).

специфичность (то есть возможность идентифицировать генно-инженерные организмы, отличить их от реципиентного и донорного организмов), чувствительность и надежность методов мониторинга генно-инженерных организмов:

отличить генно-инженерный штамм от реципиентного организма можно с помощью молекулярно-генетических методов. Предполагается использовать метод полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами (THRE-ch-F: TTACAGCCTTCCTGACTCAC и THRE-ch-R: TATCTGTCTGTGCGCTATGC; температура отжига: 52°C, время элонгации: 44 с), которые способны парно отжечься только на цепи ДНК генно-инженерного микроорганизма и сформировать ампликон длиною в 711 п.н. Чувствительность такого метода по литературным данным составляет 1-10 молекул ДНК на анализируемый объём.

методы выявления переноса трансгенов другим организмам:

сравнение генома генно-инженерных бактерий с геномом организма, в который мог произойти перенос трансгенов;

продолжительность и частота мониторинга:
по мере необходимости.

6.3. контроль высвобождения генно-инженерных организмов:

методы и процедуры, позволяющие избежать или минимизировать рассеивание генно-инженерных организмов за пределы территории, определенной для проведения высвобождения генно-инженерных организмов:

работа с генно-инженерным штаммом *Escherichia coli* JUTH1801 будет осуществляться в полностью замкнутой системе, без его высвобождения в окружающую среду. После культивирования микроорганизма в замкнутой системе вся биомасса и реактор будет подвергаться обеззараживанию. Обеззараживание будет проводиться согласно Инструкции о порядке обеззараживания непатогенных генно-инженерных организмов, утвержденной Постановлениями Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь от 31.05.2019 №12.

методы и процедуры, направленные на охрану территории высвобождения от вторжения посторонних лиц:

на производстве ЗАО «БНБК» имеется система контроля доступа для защиты от вторжения посторонних лиц (КПП с постоянным присутствием охраны, система электронных пропусков).

методы и процедуры, предохраняющие территорию от нежелательного посещения другими организмами:

работа только со стерильными средами и ёмкостями.

6.4. очистка территории:

тип и предполагаемый объем загрязнения территории в результате высвобождения генно-инженерных организмов:

предполагается контаминация генно-инженерными микроорганизмами только замкнутой системы линии по производству кормовой добавки «L- треонин 98,5%», которая после завершения каждого производственного цикла будет подвергаться обеззараживанию.

возможные риски, связанные с загрязнением территории:

отсутствуют.

описание предполагаемых действий по устранению загрязнения:

обработка поверхностей дезинфицирующими растворами; автоклавирование отработанных материалов.

6.5. план действий в чрезвычайных ситуациях:

методы и процедуры контроля генно-инженерных организмов в случае непредвиденного распространения:

на поверхностях оборудования, мебели, стен и полов; одежды и кожных покровов людей используется метод смывов.

Отбор проб проводится следующим образом:

– маркируют пробирки (с вмонтированными в пробки аппликаторами с вискозными тампонами): указывают номер точки отбора проб, дату отбора;
– увлажняют аппликатор в 0,2 мл раствора натрия хлорида 0,9%;
– извлекают стерильный аппликатор из пробирки;
– делают смыв с участка общей площадью 100 см² (4 по 25 см²):
  - очерчивают смоченным тампоном квадрат размером приблизительно 5×5 см^2 (либо используют трафарет для взятия смыва);
  - тщательно заштриховывают очерченную поверхность в вертикальном направлении, проводя последовательные полосы и вращая аппликатор в соответствии со схемой, представленной на *Рис.1*, под углом 5-10°;
  - переворачивают аппликатор на 90º и аналогично заштриховывают очерченную поверхность в горизонтальном направлении;
– при отборе проб с мелких предметов смыв делают со всей поверхности предмета;
– после отбора смыва аппликатор вставляют в пробирку, не касаясь края, наружной/ внутренней поверхности пробирки и остатков раствора натрия хлорида 0,9%;
– пробирки с отобранными пробами устанавливают в штатив.

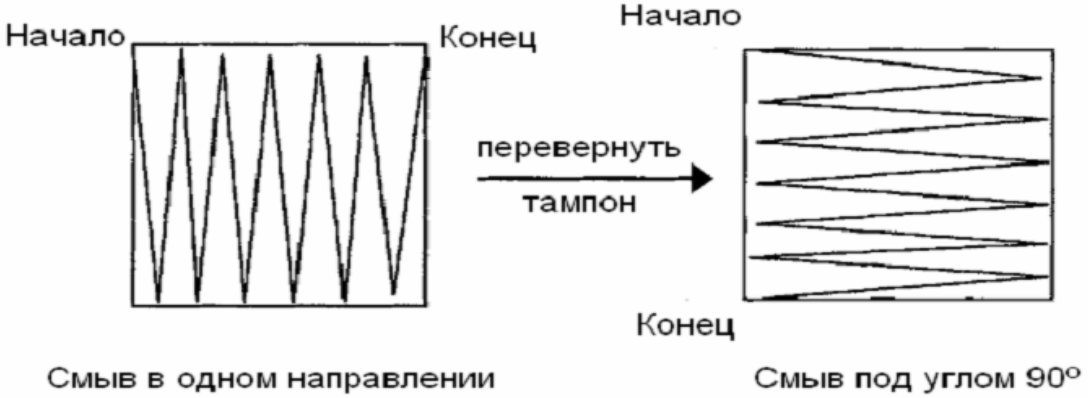

Рис.1.Схема отбора смыва

Пробы транспортируют в микробиологическую лабораторию и немедленно осуществляют посев на питательные среды.

Испытание проводит инженер-микробиолог/ лаборант-микробиолог в боксе в ламинарном шкафу (зона А класса чистоты).

Посев смыва на питательную среду осуществляют следующим образом:

– маркируют чашки Петри: указывают номер точки отбора проб, дату отбора;
– извлекают аппликатор, не касаясь поверхностей и края пробирки;

– слегка надавливая и вращая тампон частыми штрихами, переносят содержимое аппликатора на поверхность двух чашек с модифицированной средой Макконки (с добавлением канамицина), согласно схеме, представленной на *Рис.2*;

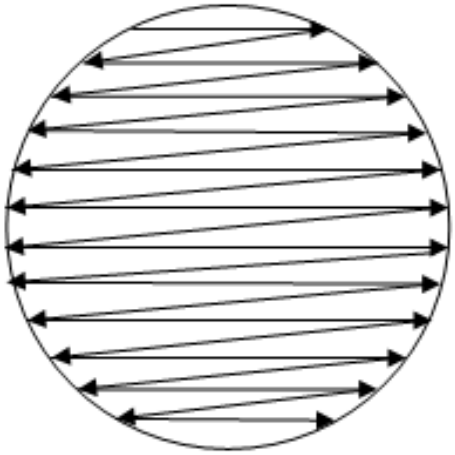

Рис.2 Схема пересева на чашку

Чашки Петри с посевами инкубируют при температуре (30-35)^{0}С в течение 24-48 часов.

Интерпретация результатов

Рост розовых или красных колоний, с зоной преципитации желчных солей или без нее, свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

- Подозрительные колонии микроскопировать. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, пересеять каждую подозрительную колонию отдельно со среды агар Макконки на среду ТСА (триптон-соевый агар) и инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С для получения суточной культуры.
- Из каждой пробирки/чашки Петри с чистой суточной культурой поставить тест на наличие фермента цитохромоксидаза: снять стерильной петлей изолированную колонию, перенести ее на реактивную зону тест-полоски и равномерно распределить. Через минуту сравнить цвет тест-полоски с прилагаемой шкалой. У оксидаза-положительных бактерий реактивная зона полоски окрашивается в цвета от голубого до пурпурного, у оксидаза-отрицательных бактерий реактивная зона полоски не изменяет окраску при нанесении культуры.
- Поставить тест на определение утилизации цитрата: пересеять суточную культуру на среду агар цитратный, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С, утилизацию цитрата определить по изменению цвета среды из зеленого в синий.
- Поставить тест на определение образования индола: пересеять суточную культуру на бульон Хоттингера, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С, наличие индола определить по появлению красного

кольца на поверхности среды бульон Хоттингера при добавлении 2-3 капель реактива для определения индола.

Если обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые не обладают ферментом цитохромоксидазой, не утилизируют цитрат натрия и образуют индол, считать, что образец контаминирован *E. coli*. В иных случаях результат отмечать следующим образом: *E. coli* не обнаружено.

в воздухе производственных помещений - седиментационный метод:

Чашки Петри со средой агар Макконки с канамицином расставляют в контрольные точки производственных помещений и оставляют в открытом состоянии на 1 час.

Пробы транспортируют в микробиологическую лабораторию и инкубируют 18-24 часа при температуре 30-35 °С.

Интерпретация результатов

Рост розовых или красных колоний, с зоной преципитации желчных солей или без нее, свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

- Подозрительные колонии микроскопировать. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, пересеять каждую подозрительную колонию отдельно со среды агар Макконки на среду ТСА (триптон-соевый агар) и инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С для получения суточной культуры.
- Из каждой пробирки/чашки Петри с чистой суточной культурой поставить тест на наличие фермента цитохромоксидаза: снять стерильной петлей изолированную колонию, перенести ее на реактивную зону тест-полоски и равномерно распределить. Через минуту сравнить цвет тест-полоски с прилагаемой шкалой. У оксидаза-положительных бактерий реактивная зона полоски окрашивается в цвета от голубого до пурпурного, у оксидаза-отрицательных бактерий реактивная зона полоски не изменяет окраску при нанесении культуры.
- Поставить тест на определение утилизации цитрата: пересеять суточную культуру на среду агар цитратный, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С, утилизацию цитрата определить по изменению цвета среды из зеленого в синий.
- Поставить тест на определение образования индола: пересеять суточную культуру на бульон Хоттингера, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С, наличие индола определить по появлению красного кольца на поверхности среды бульон Хоттингера при добавлении 2-3 капель реактива для определения индола.

Если обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые не обладают ферментом цитохромоксидазой, не утилизируют цитрат натрия и образуют индол, считать, что образец контаминирован *E. coli*.

в образцах воды и почвы – высев на агаризованную среду:

- 10 мл образца или количество, соответствующее 1 г (мл) продукта, поместить в соответствующее количество среды ТСБ, перемешать и инкубировать в течение 18-24 часа при температуре 30-35°С.
- Встряхнуть емкость, 1 мл гомогената со среды ТСБ внести в 100 мл питательной среды бульон Макконки с канамицином, перемешать и инкубировать 24-48 часов при температуре 30-35 °С.
- Со среды бульон Макконки сделать пересев на среду агар Макконки с канамицином и инкубировать 18-72 часа при температуре 30-35°С.

Интерпретация результатов

Рост розовых или красных колоний, с зоной преципитации желчных солей или без нее, свидетельствует о возможном присутствии *E. coli*. Результат подтверждается идентификационными испытаниями.

- Подозрительные колонии микроскопировать. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, пересеять каждую подозрительную колонию отдельно со среды агар Макконки на среду ТСА (триптон-соевый агар) и инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С для получения суточной культуры.
- Из каждой пробирки/чашки Петри с чистой суточной культурой поставить тест на наличие фермента цитохромоксидаза: снять стерильной петлей изолированную колонию, перенести ее на реактивную зону тест-полоски и равномерно распределить. Через минуту сравнить цвет тест-полоски с прилагаемой шкалой. У оксидаза-положительных бактерий реактивная зона полоски окрашивается в цвета от голубого до пурпурного, у оксидаза-отрицательных бактерий реактивная зона полоски не изменяет окраску при нанесении культуры.
- Поставить тест на определение утилизации цитрата: пересеять суточную культуру на среду агар цитратный, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С, утилизацию цитрата определить по изменению цвета среды из зеленого в синий.
- Поставить тест на определение образования индола: пересеять суточную культуру на бульон Хоттингера, инкубировать 18-24 часа при температуре 30-35°С, наличие индола определить по появлению красного кольца на поверхности среды бульон Хоттингера при добавлении 2-3 капель реактива для определения индола.

Если обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые не обладают ферментом цитохромоксидазой, не утилизируют цитрат натрия и образуют индол, считать, что образец контаминирован *E. coli*.

методы обеззараживания пораженных территорий, например, уничтожения генно-инженерных организмов:

использование дезинфицирующих средств в соответствии с инструкцией по применению.

методы утилизации или оздоровления растений, животных и других организмов, которые оказались подвергнуты воздействию генно-инженерных организмов в ходе или после их непредвиденного распространения:

не требуются.

методы изоляции пораженных территорий:

не требуются.

планы защиты здоровья человека и охраны окружающей среды в случае обнаружения нежелательных воздействий генно-инженерных организмов:

не требуются.

_____ Д.Т.Урицкий

подпись заявителя