УТВЕРЖДАЮ
Директор Института микробиологии
НАН Беларуси, д.б.н., проф., чл.-корр.

_____ Э.И.Коломиец
«13» декабря 2021 г.

ПРОТОКОЛ
оценки рисков возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду

1. Организация, проводящая оценку рисков возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду (далее – оценка рисков) – Государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» (Институт микробиологии НАН Беларуси). Решением Минского городского исполнительного комитета от 14.07.2000 № 785 учреждение зарегистрировано в установленном порядке и включено в Единый государственный регистр юридических лиц и индивидуальных предпринимателей за № 100289066. Предмет деятельности и основной вид экономической деятельности учреждения – научные исследования и разработки в области биотехнологий «72110». Юридический адрес: 220141, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 2; тел./факс: +375 (17) 395-47-66; электронная почта: microbio@mbio.bas-net.by.

Постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.06.2019 №382 «Об оценке рисков в генно-инженерной деятельности и выдаче разрешительного документа» Институт микробиологии НАН Беларуси включен в перечень организаций, уполномоченных проводить оценку рисков.

2. Заказчик проведения оценки рисков – Закрытое акционерное общество «Белорусская национальная биотехнологическая корпорация» (ЗАО «БНБК»). Решением Минского областного исполнительного комитета от 11.08.2016 общество зарегистрировано в установленном порядке и включено в Единый государственный регистр юридических лиц и индивидуальных предпринимателей за № 690664593. Основной вид деятельности организации – производство готовых кормов и кормовых добавок для сельскохозяйственных животных «10910». Юридический адрес: 222860, Минская область, Пуховичский район, Дукорский с/с, 27; тел./факс: 8(017) 555-40-61 (51); электронная почта: info@bnbc.by.

3. Цель проведения оценки рисков – государственная регистрация генно-инженерно-модифицированного микроорганизма для использования в хозяйственных целях (промышленное получение аминокислоты L-триптофан в замкнутой системе на заводе по производству кормовых аминокислот ЗАО «БНБК»).

4. Оценка рисков осуществлялась в соответствии со следующими нормативными документами:

законом Республики Беларусь от 09.01.2006 № 96-З «О безопасности генно-инженерной деятельности»;

положением о порядке проведения оценки рисков возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека и окружающую среду, утвержденным постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 12.06.2019 № 382 (далее – Положение);

инструкцией по применению «Порядок проведения оценки риска возможных вредных воздействий генно-инженерных организмов на здоровье человека», утвержденной Заместителем Министра, главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 25.08.2006, регистрационный № 076-0806;

методическими рекомендациями «Оценка рисков воздействия ГМО на сохранение и устойчивое использование биологического разнообразия с учетом рисков для здоровья человека»;

руководством по оценке рисков в отношении живых измененных организмов, разработанным в рамках Совещания Сторон Картахенского протокола по биобезопасности;

методикой производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных организмов, используемых для производства кормов и кормовых добавок для животных, утвержденной приказом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 27.03.2020 № 160;

руководством по оценке рисков генетически модифицированных микроорганизмов и их продуктов, предназначенных для производства кормов и продуктов питания, опубликованным Европейским ведомством по безопасности продуктов питания (Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use, EFSA Panel on Genetically Modified Organisms);

иными национальными и международными нормативными документами.

5. Объект проведения оценки рисков – генно-инженерно-модифицированный штамм бактерий *Escherichia coli* JUTR1801 – продуцент L-триптофана. Штамм депонирован в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов под регистрационным номером *Escherichia coli* БИМ В-1681 Г (дата депонирования – 20.05.2021; форма депонирования – «гарантийное хранение»; депозитор – ЗАО «БНБК»).

6. Создатель генно-инженерно-модифицированного организма – Цзяннаньский университет (Jiangnan University), г. Уси, Китайская Народная Республика.

7. Организацией-заказчиком для проведения оценки рисков предоставлен образец культуры бактерий *Escherichia coli* JUTR1801 и следующие документы:

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;

отчет о выполнении НИР «Полногеномное секвенирование двух штаммов *Escherichia coli* и одного штамма *Corynebacterium glutamicum*» от 15.12.2020 (копия);

справка о депонировании штамма от 20.05.2021 (копия);

заключение Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены» о токсико-гигиенической оценке штаммов-продуцентов от 16.08.2021 №08-02-08/661/1815 (копия);

заключение Республиканского дечернего научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» о ветеринарно-токсикологическом исследовании штамма бактерий *Escherichia coli* JUTR1801 от 08.02.2021 (копия);

протокол испытаний токсичности штамма *Escherichia coli* JUTR1801, выданный Центром по надзору, контролю и тестированию качества зерна, масла, пищевых продуктов и кормов в г. Уси Китайского государственного управления продовольствия (копия);

протокол испытаний токсигенности штамма *Escherichia coli* JUTR1801, выданный Центром по надзору, контролю и тестированию качества зерна, масла, пищевых продуктов и кормов в г. Уси Китайского государственного управления продовольствия (копия);

протокол испытаний патогенности штамма *Escherichia coli* JUTR1801, выданный Центром по надзору, контролю и тестированию качества зерна,

масла, пищевых продуктов и кормов в г. Уси Китайского государственного управления продовольствия (копия);

инструкция по осуществлению производственного контроля в области безопасности генно-инженерной деятельности, утвержденная директором ЗАО «БНБК» 04.10.2021 (копия);

инструкция о порядке обезвреживания непатогенных генно-инженерных микроорганизмов, утвержденная директором ЗАО «БНБК» 04.10.2021 (копия).

В предоставленных документах содержатся необходимые для проведения оценки рисков сведения о штамме-реципиенте; вносимых генетических изменениях; полученном генно-инженерно-модифицированном организме, включая результаты его токсико-гигиенической оценки; описание методики, позволяющей идентифицировать генно-инженерно-модифицированный организм; мерах по обеспечению безопасности при работе с генно-инженерно-модифицированным организмом.

8. При проведении оценки рисков оценивали потенциальную опасность штамма-реципиента, внесенного генетического материала, полученного генно-инженерно-модифицированного организма, а также риски, возникающие при использовании генно-инженерно-модифицированного организма в хозяйственных целях.

9. Характеристика реципиентного организма.

Таксономическая принадлежность реципиентного организма:

Домен: Бактерии (*Bacteria*)

Отдел: *Proteobacteria*

Класс: *Gammaproteobacteria*

Порядок: *Enterobacterales*

Семейство: *Enterobacteriaceae*

Род: *Escherichia*

Вид: *Escherichia coli*

Штамм: *Escherichia coli* W3110 (производный от типового штамма *E. coli* K-12).

Геном реципиентного штамма депонирован в ГенБанке (код доступа AP009048.1).

Штамм *E. coli* K-12 и его производные широко используются в качестве модельных организмов в исследованиях в области генетики, биохимии и физиологии прокариот, а также в промышленных целях. Они являются одними из наиболее хорошо изученных микроорганизмов с подтверждённой безопасностью (https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/fra004.pdf).

В норме бактерии *E. coli* K-12 не способны колонизировать кишечник человека [1], не обладают полным комплексом липополисахаридов (т.е. лишены О-антигена) [2, 3], не содержат активных факторов вирулентности (например, токсинов) или факторов колонизации и генов, кодирующих такие факторы. В окружающей среде (вне лабораторных условий) клетки *E. coli* K-12 выживают не дольше 30 дней, поскольку не способны конкурировать с аутохтонной микробиотой [4-6].

Штамм *E. coli* K-12 и его производные являются непатогенными и относятся к 1 группе риска согласно классификации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (https://2014.igem.org/Safety/Risk_Group_Guide). За несколько десятилетий использования в качестве промышленных продуцентов генно-инженерно-модифицированных штаммов на основе *E. coli* K-12, не задокументировано ни одного случая связанного с ними заболевания человека или животных. В Европейском союзе разрешено промышленное получение кормовых аминокислот с помощью генно-инженерно-модифицированных штаммов – производных *E. coli* K-12 (например, *E. coli* KCCM 80152 – продуцента L-триптофана [8], *E. coli* GCMCC 7.232 – продуцента L-треонина [9], *E. coli* NITE BP-02351 – продуцента L-лейцина [10], *E. coli* K12 AG3149 – продуцента L-изолейцина [11]). Эти данные подтверждают безопасность штамма-реципиента.

Имеются общепринятые методы, позволяющие выявлять и идентифицировать бактерии *E. coli* в различных биотопах. В Республике Беларусь действует ряд стандартов, которые регламентируют процедуру микробиологического анализа кишечной палочки, в том числе в пищевых продуктах и кормах [12-15].

Перечисленные факты позволяют рассматривать реципиентный штамм *E. coli* W3110 как представляющий минимальную опасность для здоровья человека и окружающей среды.

10. Характеристика генетической модификации.

Для создания генно-инженерно-модифицированного штамма бактерий *E. coli* JUTR1801 использовался метод трансформации реципиентного штамма генно-инженерной плазмидой, содержащей гены, кодирующие ферменты биосинтеза L-триптофана.

В качестве вектора для введения ДНК использовалась плазмида, производная от pBR322. Плазмида pBR322 создана на основе природного репликона плазмиды ColE1, состоит из 4361 пары нуклеотидов и имеет два гена устойчивости к антибиотикам – ген *bla*, кодирующий β-лактамазу, и ген *tetA*, кодирующий металл-тетрациклин / H^+-антипортер. Ни один из этих генов не входит в состав транспозона и не может быть перенесен *in vivo* в

другую плазмиду. Плазмида pBR322 не является мобилизуемым вектором. Но из-за наличия в её составе *bom*-последовательности (основы мобильности), частота передачи может составлять от 8×10^{-1} до $1{,}6 \times 10^{-4}$ при наличии дополнительной конъюгативной плазмиды [16]. Распространение плазмид на основе ColE1 репликона ограничено бактериями семейства *Enterobacteriaceae.* Однако при встраивании мобильных генетических элементов или гомологичной рекомбинации плазмиды могут расширить круг хозяев из-за приобретения дополнительных генетических детерминант [17]. Плазмида pBR322 на протяжении 1980-1990-х годов являлась стандартным вектором и использовалась в подавляющем большинстве генно-инженерных исследований. Аннотированная последовательность нуклеотидов pBR322 доступна по адресу https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/208958.

Донором вводимой ДНК являлся штамм *E. coli* W3110, т.е. в клетках штамма-реципиента увеличено количество собственных генов:

- *trpE* (кодирует компонент I антранилатсинтазы);
- *trpD* (кодирует антранилатфосфорибозилтрансферазу);
- *trpCF* (кодирует фосфорибозилантранилатизомеразу);
- *trpB* (кодирует бета-субъединицу триптофансинтазы);
- *trpA* (кодирует альфа-субъединицу триптофансинтазы)

(перечисленные гены организованы в оперон *trpEDCFBA* под контролем *tac*-промотора);

- *aroG* (кодирует 3-дезокси-7-фосфогептулонатсинтазу);
- *serA* (кодирует фосфоглицератдегидрогеназу);

(перечисленные гены организованы в оперон *aroG-serA* под контролем *tac*-промотора);

- *lacI* (кодирует репрессор лактозного оперона под контролем *lac*-промотора).

Добавлен ген из плазмиды pSC101, продукт которого сообщает трансгенному микроорганизму способность расти на средах с добавлением антибиотика тетрациклина:

- *tetA* (кодирует металл-тетрациклин / H^+-антипортер под контролем *tet*-промотора).

В составе рекомбинантной плазмиды содержится ген *tetA*, детерминирующий устойчивость к антибиотику тетрациклину. Поскольку данный ген не окружен мобильными генетическими элементами, pBR322 не является мобилизуемым вектором, а штамм *E. coli* JUTR1801 будет использоваться в замкнутой системе, вероятность передачи гена *tetA* другим микроорганизмам чрезвычайно низка и данный факт представляет минимальный риск для здоровья человека и окружающей среды. Другие потенциально опасные последовательности (гены, кодирующие факторы

патогенности и вирулентности, др.) в ДНК, вводимой в клетки штамма-реципиента, отсутствуют.

Последовательность встроенного фрагмента ДНК полностью определена с помощью секвенирования и содержит (за исключение гена *tetA)* только гены, необходимые для повышения уровня биосинтеза L-триптофана.

Последовательность нуклеотидов встроенного фрагмента ДНК:

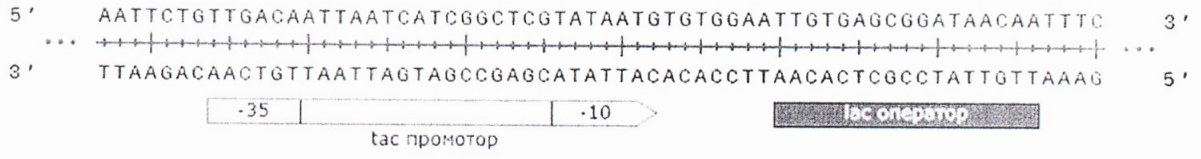
```
   1 CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTCACCTAG
  81 ATCCTTTTCC GGAATTAATT CGAGCTCGGT ACCCCATTTA CGTTGACACC ATCGAATGGC GCAAAACCTT TCGCGGTATG
 161 GCATGATAGC GCCCGGAAGA GAGTCAATTC AGGGTGGTGA ATGTGAAACC AGTAACGTTA TACGATGTCG CAGAGTATGC
 241 CGGTGTCTCT TATCAGACCG TTTCCCGCGT GGTGAACCAG GCCAGCCACG TTTCTGCGAA AACGCGGGAA AAAGTGGAAG
 321 CGGCGATGGC GGAGCTGAAT TACATTCCCA ACCGCGTGGC ACAACAACTG GCGGGCAAAC AGTCGTTGCT GATTGGCGTT
 401 GCCACCTCCA GTCTGGCCCT GCACGCGCCG TCGCAAATTG TCGCGGCGAT TAAATCTCGC GCCGATCAAC TGGGTGCCAG
 481 CGTGGTGGTG TCGATGGTAG AACGAAGCGG CGTCGAAGCC TGTAAAGCGG CGGTGCACAA TCTTCTCGCG CAACGCGTCA
 561 GTGGGCTGAT CATTAACTAT CCGCTGGATG ACCAGGATGC CATTGCTGTG GAAGCTGCCT GCACTAATGT TCCGGCGTTA
 641 TTTCTTGATG TCTCTGACCA GACACCCATC AACAGTATTA TTTTCTCCCA TGAAGACGGT ACGCGACTGG GCGTGGAGCA
 721 TCTGGTCGCA TTGGGTCACC AGCAAATCGC GCTGTTAGCG GGCCCATTAA GTTCTGTCTC GGCGCGTCTG CGTCTGGCTG
 801 GCTGGCATAA ATATCTCACT CGCAATCAAA TTCAGCCGAT AGCGGAACGG GAAGGCGACT GGAGTGCCAT GTCCGGTTTT
 881 CAACAAACCA TGCAAATGCT GAATGAGGGC ATCGTTCCCA CTGCGATGCT GGTTGCCAAC GATCAGATGG CGCTGGGCGC
 961 AATGCGCGCC ATTACCGAGT CCGGGCTGCG CGTTGGTGCG GATATCTCGG TAGTGGGATA CGACGATACC GAAGACAGCT
1041 CATGTTATAT CCCGCCGTTA ACCACCATCA AACAGGATTT TCGCCTGCTG GGGCAAACCA GCGTGGACCG CTTGCTGCAA
1121 CTCTCTCAGG GCCAGGCGGT GAAGGGCAAT CAGCTGTTGC CCGTCTCACT GGTGAAAAGA AAAACCACCC TGGCGATAAG
1201 CTCTAAGAAA CCATTATTAT CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCCC TTTCGTCTTC AAGAATTCTG
1281 TTGACAATTA ATCATCGGCT CGTATAATGT GTGGAATTGT GAGCGGATAA CAATTTCACA CAGGAAACAG CTATGACCAT
1361 GATTACGGAT TCACTGGAAT TCCTTGTTGA TCGCGCTTTG ATATACGCCG AGATCATGAA CAAAATTAGA GAATAACAAT
1441 GCAAACACAA AAACCGACTC TCGAACTACT AACCTGCGAA GGCGCTTATC GCGACAACCC GACCGCGCTT TTTCACCAGT
1521 TGTGTGGGGA TCGTCCGGCA ACGCTGCTGC TGGAATCCGC AGATATCGAC AGCAAAGATG ATTTAAAAAG CCTGCTACTG
1601 GTAGACAGTG CGCTGCGCAT TACAGCATTA GGTGACACTG TCACAATTAA GGCGTTATCC GGCAATGGTG AAGCCCTGCT
1681 GGCACTACTG GATAACGCCC TGCCTGCGGG TGTGGAAAAT GAACAATCAC CAAACTGCCG TGTGCTGCGC TTCCCCCcTG
1761 TCAGTCCACT GCTGGATGAA GACGCTCGCT TATGCTCCCT TTCGGTTTTT GACGCTTTCC GTTTATTGCA GAATCTGTTG
1841 AATGTACCGA AGGAAGAACG AGAAGCCATG TTCTTCGGCG GCCTGTTCTC TTATGACCTT GTGGCGGGAT TTGAAGATTT
1921 ACCGCAACTG TCAGCGGAAA ATAACTGCCC TGATTTCTGT TTTTATCTCG CTGAAACGCT GATGGTGATT GACCATCAGA
2001 AAAAAaGCAC CCGTATTCAG GCCAGCCTGT TTGCTCCGAA TGAAGAAGAA AAACAACGTC TCACTGCTCG CCTGAACGAA
2081 CTACGTCAGC AACTGACCGA AGCCGCGCCG CCGCTGCCAG TGGTTTCCGT GCCGCATATG CGTTGTGAAT GTAATCAGAG
2161 CGATGAAGAG TTCGGTGGCG TAGTGCGTTT GTTGCAAAAA GCGATTCGCG CTGGAGAAAT TTTCCACGTG GTGCCATCTC
2241 GCCGTTTCTC TCTGCCCTGC CCGTCACCGC TGGCGGCCTA TTACGTGCTG AAAAAGAGTA ATCCCAGCCC GTACATGTTT
2321 TTTATGCAGG ATAATGATTT CACCCTATTT GGCGCGTCGC CGGAAAGCTC GCTCAAGTAT GATGCCACCA GCCGCCAGAT
2401 TGAGATCTAC CCGATTGCCG GAACACGCCC ACGCGGTCGT CGCGCCGATG GTTCACTGGA CAGAGATCTC GACAGCCGTA
2481 TTGAACTGGA AATGCGTACC GATCATAAAG AGCTGTCTGA ACATCTGATG CTGGTTGATC TCGCCCGTAA TGATCTGGCA
2561 CGCATTTGCA CCCCCGGCAG CCGCTACGTC GCCGATCTCA CCAAAGTTGA CCGTTATTCC TATGTGATGC ACCTCGTCTC
2641 TCGCGTAGTC GGCGAACTGC GTCACGATCT TGACGCCCTG CACGCTTATC GCGCCTGTAT GAATATGGGG ACGTTAAGCG
2721 GTGCGCCGAA AGTACGCGCT ATGCAGTTAA TTGCCGAGGC GGAAGGTCGT CGCCGCGGCA GCTACGGCGG CGCGGTAGGT
2801 TATTTCACCG CGCATGGCGA TCTCGACACC TACATTGTGA TCCGCTCGGC GCTGGTGGAA AACGGTATCG CCACCGTGCA
2881 AGCGGGTGCT GGTGTAGTCC TTGATTCTGT TCCGCAGTCG GAAGCCGACG AAACCCGTAA CAAAGCCCGC GCTGTACTGC
2961 GCGCTATTGC CACCGCGCAT CATGCACAGG AGACTTTCTG ATGGCTGACA TTCTGCTGCT CGATAATATC GACTCTTTTA
3041 CGTACAACCT GGCAGATCAG TTGCGCAGCA ATGGGCATAA CGTGGTGATT TACCGCAACC ATATTCCGGC GCAAACCTTA
3121 ATTGAACGCC TGGCGACCAT GAGCAATCCG GTGCTGATGC TTTCTCCTGG CCCCGGTGTG CCGAGCGAAG CCGGTTGTAT
3201 GCCGGAACTC CTCACCCGCT TGCGTGGCAA GCTGCCCATT ATTGGCATTT GCCTCGGACA TCAGGCGATT GTCGAAGCTT
3281 ACGGGGGCTA TGTCGGTCAG GCGGGCGAAA TTCTCCACGG TAAAGCCTCC AGCATTGAAC ATGACGGTCA GGCGATGTTT
3361 GCCGGATTAA CAAACCCGCT GCCGGTGGCG CGTTATCACT CGCTGGTTGG CAGTAACATT CCGGCCGGTT TAACCATCAA
3441 CGCCCATTTT AATGGCATGG TGATGGCAGT ACGTCACGAT GCGGATCGCG TTTGTGGATT CCAGTTCCAT CCGGAATCCA
3521 TTCTCACCAC CCAGGGCGCT CGCCTGCTGG AACAAACGCT GGCCTGGGCG CAGCAGAAAC TAGAGCCAGC CAACACGCTG
3601 CAACCGATTC TGGAAAAACT GTATCAGGCG CAGACGCTTA GCCAACAAGA AAGCCACCAG CTGTTTTCAG CGGTGGTGCG
3681 TGGCGAGCTG AAGCCGGAAC AACTGGCGGC GGCGCTGGTG AGCATGAAAA TTCGCGGTGA GCACCCGAAC GAGATCGCCG
3761 GGGCAGCAAC CGCGCTACTG GAAAACGCAG CGCCGTTCCC GCGCCCGGAT TATCTGTTTG CTGATATCGT CGGTACTGGC
3841 GGTGACGGCA GCAACAGTAT CAATATTTCT ACCGCCAGTG CGTTTGTCGC CGCGGCCTGT GGGCTGAAAG TGGCGAAACA
3921 CGGCAACCGT AGCGTCTCCA GTAAATCTGG TTCGTCCGAT CTGCTGGCGG CGTTCGGTAT TAATCTTGAT ATGAACGCCG
4001 ATAAATCGCG CCAGGCGCTG GATGAGTTAG GTGTATGTTT CCTCTTTGCG CCGAAGTATC ACACCGGATT CCGCCACGCG
4081 ATGCCGGTTC GCCAGCAACT GAAAACCCGC ACCCTGTTCA ATGTGCTGGG GCCATTGATT AACCCGGCGC ATCCGCCGCT
4161 GGCGTTAATT GGTGTTTATA GTCCGGAACT GGTGCTGCCG ATTGCCGAAA CCTTGCGCGT GCTGGGGTAT CAACGCGCGG
4241 CGGTGGTGCA CAGCGGCGGG ATGGATGAAG TTTCATTACA CGCGCCGACA ATCGTTGCCG AACTGCATGA CGGCGAAATT
4321 AAAAGCTATC AGCTCACCGC AGAAGACTTT GGCCTGACAC CCTACCACCA GGAGCAACTG GCAGGCGGAA CACCGGAAGA
4401 AAACCGTGAC ATTTTAACAC GTTTGTTACA AGGTAAAGGC GACGCCGCCC ATGAAGCAGC CGTCGCTGCG AACGTCGCCA
4481 TGTTAATGCG CCTGCATGGC CATGAAGATC TGCAAGCCAA TGCGCAAACC GTTCTTGAGG TACTGCGCAG TGGTTCCGCT
4561 TACGACAGAG TCACCGCACT GGCGGCACGA GGGTAAATGA TGCAAACCGT TTTAGCGAAA ATCGTCGCAG ACAAGGCGAT
4641 TTGGGTAGAA GCCCGCAAAC AGCAGCAACC GCTGGCCAGT TTTCAGAATG AGGTTCAGCC GAGCACGCGA CATTTTTATG
4721 ATGCGCTACA GGGTGCGCGC ACGGCGTTTA TTCTGGAGTG CAAGAAAGCG TCGCCGTCAA AAGGCGTGAT CCGTGATGAT
4801 TTCGATCCAG CACGCATTGC CGCCATTTAT AAACATTACG CTTCGGCAAT TTCGGTGCTG ACTGATGAGA AATATTTTCA
4881 GGGGAGCTTT AATTTCCTCC CCATCGTCAG CCAAATCGCC CCGCAGCCGA TTTTATGTAA AGACTTCATT ATCGACCCTT
4961 ACCAGATCTA TCTGGCGCGC TATTACCAGG CCGATGCCTG CTTATTAATG CTTTCAGTAC TGGATGACGA CCAATATCGC
5041 CAGCTTGCCG CCGTCGCTCA CAGTCTGGAG ATGGGGGTGC TGACCGAAGT CAGTAATGAA GAGGAACAGG AGCGCGCCAT
5121 TGCATTGGGA GCAAAGGTCG TTGGCATCAA CAACCGCGAT CTGCGTGATT TGTCGATTGA TCTCAACCGT ACCCGCGAGC
5201 TTGCGCCGAA ACTGGGGCAC AACGTGACGG TAATCAGCGA ATCCGGCATC AATACTTACG CTCAGGTGCG CGAGTTAAGC
5281 CACTTCGCTA ACGGTTTTCT GATTGGTTCG GCGTTGATGG CCCATGACGA TTTGCACGCC GCCGTGCGCC GGGTGTTGCT
5361 GGGTGAGAAT AAAGTATGTG GCCTGACGCG TGGGCAAGAT GCTAAAGCAG CTTATGACGC GGGCGCGATT TACGGTGGGT
```

5441 TGATTTTTGT TGCGACATCA CCGCGTTGCG TCAACGTTGA ACAGGCGCAG GAAGTGATGG CTGCGGCACC GTTGCAGTAT
5521 GTTGGCGTGT TCCGCAATCA CGATATTGCC GATGTGGTGG ACAAAGCTAA GGTGTTATCG CTGGCGGCAG TGCAACTGCA
5601 TGGTAATGAA GAACAGCTGT ATATCGATAC GCTGCGTGAA GCTCTGCCAG CACATGTTGC CATCTGGAAA GCATTAAGCG
5681 TCGGTGAAAC CCTGCCCGCC CGCGAGTTTC AGCACGTTGA TAAATATGTT TTAGACAACG GCCAGGGTGG AAGCGGGCAA
5761 CGTTTTGACT GGTCACTATT AAATGGTCAA TCGCTTGGCA ACGTTCTGCT GGCGGGGGgC TTAGGCGCAG ATAACTGCGT
5841 GGAAGCGGCA CAAACCGGCT GCGCCGGACT TGATTTTAAT TCTGCTGTAG AGTCGCAACC GGGCATCAAA GACGCACGTC
5921 TTTTGGCCTC GGTTTTCCAG ACGCTGCGCG CATATTAAGG AAAGGAACAA TGACAACATT ACTTAACCCC TATTTTGGTG
6001 AGTTTGGCGG CATGTACGTG CCACAAATCC TGATGCCTGC TCTGCGCCAG CTGGAAGAAG CTTTTGTCAG TGCGCAAAAA
6081 GATCCTGAAT TTCAGGCTCA GTTCAACGAC CTGCTGAAAA ACTATGCCGG GCGTCCAACC GCGCTGACCA AATGCCAGAA
6161 CATTACAGCC GGGACGAACA CCACGCTGTA TCTCAAGCGT GAAGATTTGC TGCACGGCGG CGCGCATAAA ACTAACCAGG
6241 TGCTGGGGCA GGCGTTGCTG GCGAAGCGGA TGGGTAAAAC CGAAATCATC GCCGAAACCG GTGCCGGTCA GCATGGCGTG
6321 GCGTCGGCCC TTGCCAGCGC CCTGCTCGGC CTGAAATGCC GTATTTATAT GGGTGCCAAA GACGTTGAAC GCCAGTCGCC
6401 TAACGTTTTT CGTATGCGCT TAATGGGTGC GGAAGTGATC CCGGTGCATA GCGGTTCCGC GACGCTGAAA GATGCCTGTA
6481 ACGAGGCGCT GCGCGACTGG TCCGGTAGTT ACGAAACCGC GCACTATATG CTGGGCACCG CAGCTGGCCC GCATCCTTAT
6561 CCGACCATTG TGCGTGAGTT TCAGCGGATG ATTGGCGAAG AAACCAAAGC GCAGATTCTG GAAAGAGAAG GTCGCCTGCC
6641 GGATGCCGTT ATCGCCTGTG TTGGCGGCGG TTCGAATGCC ATCGGCATGT TTGCTGATTT CATCAATGAA ACCAACGTCG
6721 GCCTGATTGG TGTGGAGCCA GGTGGTCACG GTATCGAAAC TGGCGAGCAC GGCGCACCGC TAAAACATGG TCGCGTGGGT
6801 ATCTATTTCG GTATGAAAGC GCCGATGATG CAAACCGAAG ACGGGCAGAT TGAAGAATCT TACTCCATCT CCGCCGGACT
6881 GGATTTCCCG TCTGTCGGCC CACAACACGC GTATCTTAAC AGCACTGGAC GCGCTGATTA CGTGTCTATT ACCGATGATG
6961 AAGCCCTTGA AGCCTTCAAA ACGCTGTGCC TGCACGAAGG GATCATCCCG GCGCTGGAAT CCTCCCACGC CCTGGCCCAT
7041 GCGTTCAAAA TGATGCGCGA AAACCCGGAT AAAGAGCAGC TACTGGTGGT TAACCTTTCC GGTCGCGGCG ATAAAGACAT
7121 CTTCACCGTT CACGATATTT TGAAAGCACG AGGGGAAATC TGATGGAACG CTACGAATCT CTGTTTGCCC AGTTGAAGGA
7201 GCGCAAAGAA GGCGCATTCG TTCCTTTCGT CACGCTCGGT GATCCGGGCA TTGAGCAGTC ATTGAAAATT ATCGATACGC
7281 TAATTGAAGC CGGTGCTGAC GCGCTGGAGT TAGGTATCCC CTTCTCCGAC CCACTGGCGG ATGGCCCGAC GATTCAAAAC
7361 GCCACTCTGC GCGCCTTTGC GGCAGGTGTG ACTCCGGCAC AATGTTTTGA AATGCTGGCA CTGATTCGCC AGAAACACCC
7441 GACCATTCCC ATTGGCCTGT TGATGTATGC CAATCTGGTG TTTAACAAAG GCATTGATGA GTTTTATGCC CAGTGCGAAA
7521 AAGTCGGCGT CGATTCGGTG CTGGTTGCCG ATGTGCCAGT TGAAGAGTCC GCGCCCTTCC GCCAGGCCGC GTTGCGTCAT
7601 AATGTCGCAC CTATCTTCAT CTGCCCGCCA AATGCCGATG ACGACCTGCT GCGCCAGATA GCCTCTTACG GTCGTGGTTA
7681 CACCTATTTG CTGTCACGAG CAGGCGTGAC CGGCGCAGAA AACCGCGCCG CGTTACCCCT CAATCATCTG GTTGCGAAGC
7761 TGAAAGAGTA CAACGCTGCA CCTCCATTGC AGGGATTTGG TATTTCCGCC CCGGATCAGG TAAAAGCAGC GATTGATGCA
7841 GGAGCTGCGG GCGCGATTTC TGGTTCGGCC ATTGTTAAAA TCATCGAGCA ACATATTAAT GAGCCAGAGA AAATGCTGGC
7921 GGCACTGAAA GTTTTTGTAC AACCGATGAA AGCGGCGACG CGCAGTTAAT CCCACAGCCG CCAGTTCCGC TGGCGGCATT
8001 TTAACTTTCT TTAATGAAGC CGGAAAAATC CTAAATTCAT TTAATATTTA TCTTTTTACC GTTTCGCTTA CCCCGGTCGA
8081 ACGTCAACTT ACGTCATTTT TCCGCCCAAC AGTAATATAA TCAAACAAAT TAATCCCGCA ACATAACACC AGTAAAATCA
8161 ATAATTTTCT CTAAGTCACT TATTCCTCAG GTAATTGTTA ATATATCCAG AATGTTCCTC AAAATATATT TTCCCTCTAT
8241 CTTCTCGTTG CGCTTAATTT GACTAATTCT CATTAGCGAC TAATTTTAAT GAGTGTCGAG GATCCCCGGG TACCCGGGGA
8321 TCCTCTAGAA CTAGGGAATT CTGTTGACAA TTAATCATCG GCTCGTATAA TGTGTGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTTC
8401 ACACAGGAAA CAGCTATGAC CATGATTACG GATTCACTGG AATTCCTTGT TGATCGCGCT TTGATATACG CCGAGATCTA
8481 AGATAAGTAT GGCAACACTG GAACAGACAT GAATTATCAG AACGACGATT TACGCATCAA AGAAATCAAA GAGTTACTTC
8561 CTCCTGTCGC ATTGCTGGAA AAATTCCCCG CTACTGAAAA TGCCGCGAAT ACGGTTGCCC ATGCCCGAAA AGCGATCCAT
8641 AAGATCCTGA AAGGTAATGA TGATCGCCTG TTGGTTGTGA TTGGCCCATG CTCAATTCAT GATCCTGTCG CGGCAAAAGA
8721 GTATGCCACT CGCTTGCTGG CGCTGCGTGA AGAGCTGAAA GATGAGCTGG AAATCGTAAT GCGCGTCTAT TTTGAAAAGC
8801 CGCGTACCAC GGTGGGCTGG AAAGGGCTGA TTAACGATCC GCATATGGAT AATAGCTTCC AGATCAACGA CGGTCTGCGT
8881 ATAGCCCGTA AATTGCTGCT TGATATTAAC GACAGCGGTC TGCCAGCGGC AGGTGAGTTT CTCGATATGA TCACCCCACA
8961 ATATCTCGCT GACCTGATGA GCTGGGGCGC AATTGGCGCA CGTACCACCG AATCGCAGGT GCACCGCGAA CTGGCATCAG
9041 GGCTTTCTTG TCCGGTCGGC TTCAAAAATG GCACCGACGG TACGATTAAA GTGGCTATCG ATGCCATTAA TGCCGCCGGT
9121 GCGCCGCACT GCTTCCTGTT CGTAACGAAA TGGGGGCATT CGGCGATTGT GAATACCAGC GGTAACGGCG ATTGCCATAT
9201 CATTCTGCGC GGCGGTAAAG AGCCTAACTA CAGCGCGAAG CACGTTGCTG AAGTGAAAGA AGGGCTGAAC AAAGCAGGCC
9281 TGCCAGCACA GGTGATGATC GATTTCAGCC ATGCTAACTC GTCCAAACAA TTCAAAAAGC AGATGGATGT TTGTGCTGAC
9361 GTTTGCCAGC AGATTGCCGG TGGCGAAAAG GCCATTATTG GCGTGATGGT GGAAAGCCAT CTGGTGGAAG GCAATCAGAG
9441 CCTCGAGAGC GGGGAGCCGC TGGCCTACGG TAAGAGCATC ACCGATGCCT GCATCGGCTG GGAAGATACC GATGCTCTGT
9521 TACGTCAACT GGCGAATGCA GTAAAAGCGC GTCGCGGGTA AGGTTTAATT GTCGGATGCG CCGTCAGAGT GGCGTATCCG
9601 ATGAATCACC ACAGGCCTGA TAAGACGCGC AGCGTCGCAT CAGGCAATGT GCTCCATTGT TAGCAACAAA AAAGCCGACT
9681 CACTTGCAGT CGGCTTTCTC ATTTTAAACG AATGACGTTT ACTTCGCTTT ACCCTGGTTT GCAACCGCCG CTGCTTTCGC
9761 TGCGATCTCG TCAGCATTAC CCAGATAATA GCGTTTCAGC GGTTTGAAAT TCTCGTCGAA CTCATACACC AGCGGCACGC
9841 CAGTCGGGAT ATTAAGCTCA AGAATCCGAC GCAAACGTTC ATATTGCCGC AATATTATTT TTTGATATGT TGAAAGGCGG
9921 ATGCAAATCC GCACACAACA TTTCAAAAGA CAGGATTGGG TAAATGGCAA AGGTATCGCT GGAGAAAGAC AAGATTAAGT
10001 TTCTGCTGGT AGAAGGCGTG CACCAAAAGG CGCTGGAAAG CCTTCGTGCA GCTGGTTACA CCAACATCGA ATTTCACAAA
10081 GGCGCGCTGG ATGATGAACA ATTAAAAGAA TCCATCCGCG ATGCCCACTT CATCGGCCTG CGATCCCGTA CCCATCTGAC
10161 TGAAGACGTG ATCAACGCCG CAGAAAAACT GGTCGCTATT GGCTGTTTCT GTATCGGAAC AAACCAGGTT GATCTGGATG
10241 CGGCGGCAAA GCGCGGGATC CCGGTATTTA ACGCACCGTT CTCAAATACG CGCTCTGTTG CGGAGCTGGT GATTGGCGAA
10321 CTGCTGCTGC TATTGCGCGG CGTGCCGGAA GCCAATGCTA AAGCGCACCG TGGCGTGTGG AACAAACTGG CGGCGGGTTC
10401 TTTTGAAGCG CGCGGCAAAA AGCTGGGTAT CATCGGCTAC GGTCATATTG GTACGCAATT GGGCATTCTG GCTGAATCGC
10481 TGGGAATGTA TGTTTACTTT TATGATATTG AAAATAAACT GCCGCTGGGC AACGCCACTC AGGTACAGCA TCTTTCTGAC
10561 CTGCTGAATA TGAGCGATGT GGTGAGTCTG CATGTACCAG AGAATCCGTC CACCAAAAAT ATGATGGGCG CGAAAGAAAT
10641 TTCACTAATG AAGCCCGGCT CGCTGCTGAT TAATGCTTCG CGCGGTACTG TGGTGGATAT TCCGGCGCTG TGTGATGCGC
10721 TGGCGAGCAA ACATCTGGCG GGGGCGGCAA TCGACGTATT CCCGACGGAA CCGGCGACCA ATAGCGATCC ATTTACCTCT
10801 CCGCTGTGTG AATTCGACAA CGTCCTTCTG ACGCCACACA TTGGCGGTTC GACTCAGGAA GCGCAGGAGA ATATCGGCCT
10881 GGAAGTTGCG GGTAAATTGA TCAAGTATTC TGACAATGGC TCAACGCTCT CTGCGGTGAA CTTCCCGGAA GTCTCGCTGC
10961 CACTGCACGG TGGGCGTCGT CTGATGCACA TCCACGAAAA CCGTCCGGGC GTGCTAACTG CGCTGAACAA AATCTTCGCC
11041 GAGCAGGGCG TCAACATCGC CGCGCAATAT CTGCAAACTT CCGCCCAGAT GGGTTATGTG GTTATTGATA TTGAAGCCGA
11121 CGAAGACGTT GCCGAAAAAG CGCTGCAGGC AATGAAAGCT ATTCCGGGTA CCATTCGCGC CCGTCTGCTG TACTAATTCC
11201 CCTTCTCTGA AAATCAACGG GCAGGTCACT GACTTGCCCG TTTTTTTATC CCTTCTCCAC ACCGTTGCCG CGTTGCTGCT
11281 CTAGAGTCAA TTCTCATGTT TGACAGCTTA TCATCGATAA GCTTTAATGC GGTAGTTTAT CACAGTTAAA TTGCTAACGC
11361 AGTCAGGCAC CGTGTATGAA ATCTAACAAT GCGCTCATCG TCATCCTCGG CACCGTCACC CTGGATGCTG TAGGCATAGG
11441 CTTGGTTATG CCGGTACTGC CGGGCCTCTT GCGGGATATC GTCCATTCCG ACAGCATCGC CAGTCACTAT GGCGTGCTGC
11521 TAGCGCTATA TGCGTTGATG CAATTTCTAT GCGCACCCGT TCTCGGAGCA CTGTCCGACC GCTTTGGCCG CCGCCCAGTC
11601 CTGCTCGCTT CGCTACTTGG AGCCACTATC GACTACGCGA TCATGGCGAC CACACCCGTC CTGTGGATCC TCTACGCCGG
11681 ACGCATCGTG GCCGGCATCA CCGGCGCCAC AGGTGCGGTT GCTGGCGCCT ATATCGCCGA CATCACCGAT GGGGAAGATC
11761 GGGCTCGCCA CTTCGGGCTC ATGAGCGCTT GTTTCGGCGT GGGTATGGTG GCAGGCCCCG TGGCCGGGGG ACTGTTGGGC

```
11841 GCCATCTCCT TGCATGCACC ATTCCTTGCG GCGGCGGTGC TCAACGGCCT CAACCTACTA CTGGGCTGCT TCCTAATGCA
11921 GGAGTCGCAT AAGGGAGAGC GTCGACCGAT GCCCTTGAGA GCCTTCAACC CAGTCAGCTC CTTCCGGTGG GCGCGGGGCA
12001 TGACTATCGT CGCCGCACTT ATGACTGTCT TCTTTATCAT GCAACTCGTA GGACAGGTGC CGGCAGCGCT CTGGGTCATT
12081 TTCGGCGAGG ACCGCTTTCG CTGGAGCGCG ACGATGATCG GCCTGTCGCT TGCGGTATTC GGAATCTTGC ACGCCCTCGC
12161 TCAAGCCTTC GTCACTGGTC CCGCCACCAA ACGTTTCGGC GAGAAGCAGG CCATTATCGC CGGCATGGCG GCCGACGCGC
12241 TGGGCTACGT CTTGCTGGCG TTCGCGACGC GAGGCTGGAT GGCCTTCCCC ATTATGATTC TTCTCGCTTC CGGCGGCATC
12321 GGGATGCCCG CGTTGCAGGC CATGCTGTCC AGGCAGGTAG ATGACGACCA TCAGGGACAG CTTCAAGGAT CGCTCGCGGC
12401 TCTTACCAGC CTAACTTCGA TCATTGGACC GCTGATCGTC ACGGCGATTT ATGCCGCCTC GGCGAGCACA TGGAACGGGT
12481 TGGCATGGAT TGTAGGCGCC GCCCTATACC TTGTCTGCCT CCCCGCGTTG CGTCGCGGTG CATGGAGCCG GGCCACCTCG
12561 ACCTGAATGG AAGCCGGCGG CACCTCGCTA ACGGATTCAC CACTCCAAGA ATTGGAGCCA ATCAATTCTT GCGGAGAACT
12641 GTGAATGCGC AAACCAACCC TTGGCAGAAC ATATCCATCG CGTCCGCCAT CTCCAGCAGC CGCACGCGGC GCATCTCGGG
12721 CAGCGTTGGG TCCTGGCCAC GGGTGCGCAT GATCGTGCTC CTGTCGTTGA GGACCCGGCT AGGCTGGCGG GGTTGCCTTA
12801 CTGGTTAGCA GAATGAATCA CCGATACGCG AGCGAACGTG AAGCGACTGC TGCTGCAAAA CGTCTGCGAC CTGAGCAACA
12881 ACATGAATGG TCTTCGGTTT CCGTGTTTCG TAAAGTCTGG AAACGCGGAA GTCAGCGCCC TGCACCATTA TGTTCCGGAT
12961 CTGCATCGCA GGATGCTGCT GGCTACCCTG TGGAACACCT ACATCTGTAT TAACGAAGCG CTGGCATTGA CCCTGAGTGA
13041 TTTTTCTCTG GTCCCGCCGC ATCCATACCG CCAGTTGTTT ACCCTCACAA CGTTCCAGTA ACCGGGCATG TTCATCATCA
13121 GTAACCCGTA TCGTGAGCAT CCTCTCTCGT TTCATCGGTA TCATTACCCC CATGAACAGA AATCCCCCTT ACACGGAGGC
13201 ATCAGTGACC AAACAGGAAA AAACCGCCCT TAACATGGCC CGCTTTATCA GAAGCCAGAC ATTAACGCTT CTGGAGAAAC
13281 TCAACGAGCT GGACGCGGAT GAACAGGCAG ACATCTGTGA ATCGCTTCAC GACCACGCTG ATGAGCTTTA CCGCAGCTGC
13361 CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA
13441 TGCCCGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC AGCCATGACC CAGTCACGTA
13521 GCGATAGCGG AGTGTATACT GGCTTAACTA TGCGGCATCA GAGCAGATTG TACTGAGAGT GCACCATATG CGGTGTGAAA
13601 TACCGCACAG ATGCGTAAGG AGAAAATACC GCATCAGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC
13681 GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA
13761 GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC
13841 CCCcTGACGA GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT
13921 CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG
14001 AAGCGTGGCG CTTTCTCATA GCTCACGCTG TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC
14081 ACGAACCCCC cGTTCAGCCC GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA
14161 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG
14241 GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG
14321 GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA
14401 AAaGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTA
```

Для увеличения экспрессии встроенных генов использовался «сильный» *tac*-промотор *E. coli,* гибрид между промоторами *trp* и *lac UV5* [18]. Векторы, несущие *tac*-промотор, при использовании изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида в качестве индуктора, обеспечивают уровни синтеза целевого белка, превышающие 10 мг/л культуры. В качестве оператора использовалась нативная последовательность из лактозного оперона *E. coli*.

Структура итоговой регуляторной кассеты:



Дополнительная копия вводимого фрагмента ДНК содержится в составе хромосомы штамма-реципиента, куда он встроился в результате гомологичной рекомбинации и одиночного кроссинговера (по гену *trpD*).

Перечисленные факты позволяют рассматривать вводимый генетический материал (вектор и целевые гены) как не представляющий опасности для здоровья человека и окружающей среды. Учитывая, что работа с генно-инженерно-модифицированным штаммом *E. coli* JUTR1801 будет осуществляться в замкнутой системе, а также низкую частоту мобилизации плазмиды pBR322, риск передачи введенного генетического материала другим микроорганизмам минимален.

11. Характеристика генно-инженерно-модифицированного организма.

Генно-инженерно-модифицированный микроорганизм *E. coli* JUTR1801 получен на основе штамма *E. coli* W3110 путем клонирования в его клетках рекомбинатной многокопийной плазмиды pBR322, содержащей гены *trpE*, *trpD*, *trpCF*, *trpB*, *trpA*, *aroG*, *serA* (кодируют ключевые ферменты биосинтеза L-триптофана), *lacI* (кодирует репрессор лактозного оперона), *tetA* (кодирует металл-тетрациклин / H^+-антипортер). Штамм содержит дополнительную копию вводимого фрагмента ДНК в составе хромосомы (включен в результате гомологичной рекомбинации). Встроенные фрагменты ДНК могут быть идентифицированы со 100% надёжностью и специфичностью с помощью полногеномного секвенирования генно-инженерно-модифицированного микроорганизма.

Привнесенные гены кодируют ключевые ферменты, участвующие в биохимическом пути синтеза L-триптофана (TrpE, TrpD, TrpCF, TrpB, TrpA, AroG, SerA), репрессор лактозного оперона (LacI) и металл-тетрациклин / H^+-антипортер (TetA), не кодируют белков, потенциально опасных для человека и окружающей среды.

Экспрессия привнесенной ДНК обеспечивает появление у рекомбинантоного штамма *E. coli* JUTR1801 следующих фенотипических признаков, не характерных для штамма-реципиента:

- повышенный синтез и накопление аминокислоты L-триптофана;
- повышенная устойчивость к терациклину;
- более медленный рост в схожих условиях.

Появление перечисленных фенотипических признаков не делает штамм *E. coli* JUTR1801 более опасным для человека и окружающей среды по сравнению со штаммом-реципиентом.

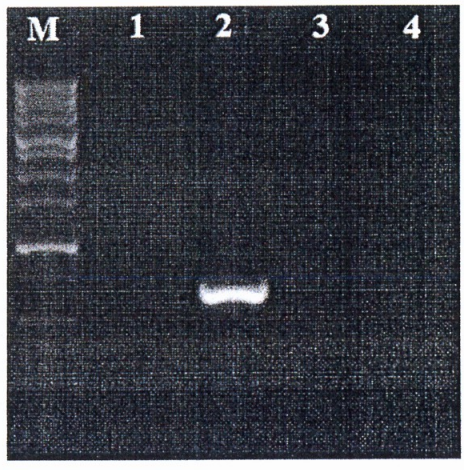
Для обнаружения и идентификации генно-инженерно-модифицированного микроорганизма *E. coli* JUTR1801 ЗАО «БНБК» разработаны штаммо-специфичные праймеры:

TRI-ch-F (5′-AGATACCGATGCTCTGTTACG-3′),

TRI-ch-R (5′-ATCACGTCTTCAGTCAGATGG-3′).

Проведение полимеразной цепной реакции с данными праймерами при оптимизированном температурно-временном режиме (1 цикл: 95°C – 3 мин; 30 циклов: 95°C – 15 с, 52°C – 15 с, 72°C – 45 с; 72°C – 3 мин) обеспечивает получение для штамма *E. coli* JUTR1801 ампликона длиною 669 пар нуклеотидов. Образования ампликонов целевого размера на матрице ДНК других штаммов *E. coli* не детектировалось (рис.). Таким образом, полимеразная цепная реакция с праймерами TRI-ch-F и TRI-ch-R является

высокоспецифичным методом детекции штамма *E. coli* JUTR1801, позволяющим выявлять его присутствие в различных образцах.



М – маркер молекулярной массы ДНК M1Kb («Праймтех»); 1 – отрицательный контроль; 2 – *E. coli* JUTR 1801; 3 – *E. coli* JUTH 1801; 4 – *E. coli* БИМ В-765

Рисунок – Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами TRI-ch-F и TRI-ch-R

Согласно заключению Республиканского дочернего научно-исследовательского унитарного предприятия «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» о ветеринарно-токсикологическом исследовании штамма бактерий *E. coli* JUTR1801 (от 08.02.2021), данный микроорганизм является непатогенным, нетоксигенным, нетоксичным и может использоваться в микробиологическом производстве.

Согласно заключению Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены» «О токсиколого-гигиенической оценке штаммов-продуцентов» (от 16.08.2021), генно-инженерно-модифицированный штамм *E. coli* JUTR1801 безопасен для здоровья человека в части токсических эффектов самого микроорганизма или продуктов его метаболизма.

Также ЗАО «БНБК» предоставлены протоколы испытаний токсичности, токсигенности и патогенности штамма *E. coli* JUTR1801, выданные Центром по надзору, контролю и тестированию качества зерна, масла, пищевых продуктов и кормов в г. Уси Китайского государственного управления продовольствия, согласно которым штамм является нетоксичным, нетоксигенным, непатогенным и безопасным для животных, может использоваться в производстве аминокислоты L-триптофан.

Перечисленные факты свидетельствуют о безопасности генно-инженерно-модифицированного микроорганизма *E. coli* JUTR1801 для

здоровья человека и окружающей среды и возможности его использования в производственном процессе.

12. Оценка рисков, возникающих при использовании генно-инженерно-модифицированного организма в хозяйственных целях.

Генно-инженерно-модифицированный микроорганизм *E. coli* JUTR1801 предназначен для использования в замкнутой системе биореакторов и сопутствующего технологического оборудования на заводе по производству кормовых аминокислот ЗАО «БНБК» с целью получения аминокислоты L-триптофан и кормовой добавки «L-триптофан 98%». Проведение процесса ферментации предполагает соблюдение условий стерильности, исключающих контакт штамма-продуцента с окружающей средой и возможность обмена генетической информацией (в том числе привнесенными генами) с другими организмами.

После культивирования *E. coli* JUTR1801 в замкнутой системе микробная биомасса будет отделяться от культуральной жидкости и подвергаться обеззараживанию. Биореактор и сопутствующее технологическое оборудование также будут подвергаться обеззараживанию после каждого производственного цикла. Таким образом, вероятность попадания жизнеспособного генно-инженерно-модифицированного микроорганизма в окружающую среду и обмена генетической информацией (в том числе привнесенными генами) с другими организмами минимальна.

Согласно сведениям, представленным ЗАО «БНБК», работа с генно-инженерно-модифицированным 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. Обеззараживание будет проводиться согласно «Инструкции о порядке обеззараживания непатогенных генно-инженерных организмов», утвержденной Постановлением Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь от 31.05.2019 №12.

На производстве ЗАО «БНБК» будет осуществляться полный контроль за состоянием, перемещением и утилизацией генно-инженерно-модифицированного штамма *E. coli* JUTR1801 в соответствии с «Инструкцией по осуществлению производственного контроля в области безопасности генно-инженерной деятельности ЗАО «БНБК»» от 04.10.2021 и «Инструкцией о порядке обезвреживания непатогенных генно-инженерных

штаммов микроорганизмов ЗАО «БНБК»» от 04.10.2021 с составлением требуемой отчетности.

На производстве ЗАО «БНБК» имеется система контроля доступа для защиты от вторжения посторонних лиц (КПП с постоянным присутствием охраны, система электронных пропусков), что делает минимальным риск несанкционированного высвобождения в окружающую среду генно-инженерно-модифицированного штамма *E. coli* JUTR1801.

Считаем достаточными указанные ЗАО «БНБК» меры безопасности при работе с генно-инженерных штаммом *E. coli* JUTR1801 в замкнутой системе.

Работа со штаммом *E. coli* JUTR1801 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». При осуществлении всех перечисленных выше мер безопасности, попадание генно-инженерно-модифицированного штамма *E. coli* JUTR1801 в источники водозабора и загрязнение ими территорий, расположенных рядом с заводом по производству кормовых аминокислот ЗАО «БНБК», исключено.

Таким образом, использование генно-инженерно-модифицированного микроорганизма *E. coli* JUTR1801 в хозяйственных целях, при соблюдении всех требований безопасности генно-инженерной деятельности, представляет минимальный риск для здоровья человека и окружающей среды. При этом считаем важным отметить недопустимость содержания остаточных количеств генно-инженерно-модифицированного штамма-продуцента в конечном продукте – кормовой добавке «L-триптофан 98%» и необходимость контроля данного показателя с помощью полимеразной цепной реакции со штаммо-специфичными праймерами согласно методике, описанной в пункте 11, или других высокочувствительных и специфичных методов исследования.

Выводы.

На основании анализа материалов ЗАО «БНБК», содержащих сведения о генно-инженерно-модифицированном штамме *E. coli* JUTR1801, риск возможного неблагоприятного воздействия данного микроорганизма на здоровье человека и окружающую среду при его использовании в хозяйственных целях в замкнутой системе, оценивается как минимальный.

Генно-инженерно-модифицированный штамм *E. coli* JUTR1801 может использоваться в качестве штамма-продуцента при производстве

аминокислоты L-триптофан и кормовой добавки «L-триптофан 98%» после его государственной регистрации Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь и при условии неукоснительного соблюдения всех требований безопасности при работе с непатогенными генно-инженерными микроорганизмами в замкнутой системе.

Литература

1. Smith H. Survival of orally administered *E. coli* K12 in alimentary tract of man // Nature 1975;255:500–502. https://doi.org/10.1038/255500a0.

2. Liu D., Reeves P.R. *Escherichia coli* K12 regains its O antigen // Microbiology. 1994;140:49-57.

3. Kuhnert P. *et al.* Rapid and accurate identification of *Escherichia coli* K-12 strains // Appl. Environ. Microbiol. 1995;61(11):4135-4139. doi:10.1128/aem.61.11.4135-4139.1995.

4. van Elsas JD *et al.* Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects // ISME J. 2011;5(2):173-183. doi:10.1038/ismej.2010.80.

5. Sørensen S.J. Survival of *Escherichia coli* K12 in seawater // FEMS Microbiol. Lett. 1991;85(2):161–167. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04708.x-i1.

6. Bogosian G. *et al.* 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.

7. Na S.H. *et al.* The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006;72:386–392. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0268-3.

8. Safety and efficacy of L-tryptophan produced by fermentation with *Escherichia coli* KCCM 80152 for all animal species // EFSA J. 2019;17(5):5695. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5695

9. Safety and efficacy of l-threonine produced by fermentation using *Escherichia coli* CGMCC 7.232 for all animal species // EFSA J. 2018;16(10):e05458. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5458.

10. Safety and efficacy of l-leucine produced by fermentation with *Escherichia coli* NITE BP-02351 for all animal species // EFSA J. 2019;17(5):e05689. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5689

11. Scientific Opinion on the safety and efficacy of L-isoleucine for all animal species // EFSA J. 2010; 8(1):1425. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1425.

12. СТБ ISO 9308-1-2016. Качество воды. Подсчет количества кишечных палочек *Escherichia coli* и колиформных бактерий.

13. ГОСТ 30726-2001. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Escherichia coli*.

14. ГОСТ ISO 21150-2018 Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Обнаружение *Escherichia coli*.

15. ГОСТ 31708-2012 (ISO 7251:2005). Микробиология пищевых продуктов и кормов. Метод обнаружения и определения количества презумптивных бактерий *Escherichia coli*. Метод наиболее вероятного числа.

16. Finnegan J., Sherratt D. Plasmid ColE1 conjugal mobility: The nature of bom, a region required in cis for transfer. Molec. Gen. Genet. 1982;185:344–351. https://doi.org/10.1007/BF00330810).

17. 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.

18. de Boer H.A., Comstock L.J., Vasser M. The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983;80(1):21-25. doi:10.1073/pnas.80.1.21.

Заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси, д.б.н., проф., чл.-корр. А.И. Зинченко

Заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси, к.б.н., доцент Л.Н. Валентович

Заведующий лабораторией «Коллекция микроорганизмов» Института микробиологии НАН Беларуси, к.б.н., доцент А.В. Сидоренко