სამაგისტრო ნაშრომი

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო

უნივერსიტეტი

აკაკი ჩარგეიშვილი

სხვადასხვა მიკროორგანიზმების მიერ გენმოდიფიცირებული სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ის უტილიზაციის შედარებითი ანალიზი

ბიოლოგიის დეპარტამენტი

სამაგისტრო პროგრამა

გამოყენებითი ბიომეცნიერებები

თემის ხელმძღვანელები:

ასისტენტ პროფესორი **ზურაბ ქუჩუკაშვილი**

ასოცირებული პროფესორი **ილია გოროზია**

თბილისი 2019 წელი

სარჩევი

ანოტაცია..... 5

Abstract ……..……... 7

შესავალი 9

1. ლიტერატურული მიმოხილვა..... 13

1.1 რეკომბინანტული დნმ ტექნოლოგიის მოკლე ისტორია..... 13

1.2 გმო ორგანიზმებისგან მომდინარე პოტენციური საფრთხე..... 14

1.3 გმო ორგანიზმები და ბიომრავალფეროვნება..... 15

1.4 გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი..... 16

1.5 თავისუფალი რეკომბინანტული დნმ-ის მდგრადობა გარემოში..... 17

1.6 ჰერბიციდ რაუნდაპ ტოლერანტული სოიო (RR soybean)..... 18

1.7 ბაქტერიული უჯრედების ტრანსფორმაცია..... 19

1.8 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ) რეალურ დროში..... 21

2. მეთოდები..... 25

2. აქტიური შტამების სკრინინგის მეთოდიკა..... 25

2.1 საკვლევი შტამები..... 25

2.2 საკვები არეები..... 25

2.3.1 ჰერბიციდ გლიფოსატის ფონზე, გლიფოსატ რეზისტენტული

გენეტიკური კონსტრუქციის გამოყენების სტიმულაცია..... 26

2.3.2 ანტიბიოტიკ კანამიცინის ფონზე, კანამიცინისადმი რეზისტენტული

გენეტიკური კონსტრუქციის გამოყენების სტიმულაცია..... 28

2.3.3 არეში არსებული რეკომბინანტული დნმ-ისგან ბაქტერიული

კულტურის გასუფთვება..... 29

2.3.4 ინკუბაციის პირობები..... 30

2.4.1 მიკროორგანიზმების მიერ სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ის

დეგრადაციის შესწავლა in vitro პირობებში..... 30

2.5 დნმ-ის ექსტრაქცია..... 31

2.6 ნიმუშებიდან ექსტრაგირებული დნმ-ის რაოდენობა ნგ/მკლ..... 34

3.1 შედეგები და განხილვა..... 37

3.2 გლიფოსატისა და კანამიცინის ფონზე, კულტივირებული

შტამების ზრდაზე დაკვირვების შედეგები..... 37

3.3 გლიფოსატისა და კანამიცინის ფონზე, კულტივირებული

შტამების გენომის სკრინინგი გმო მარკერებზე..... 38

3.4.1 მიკროორგანიზმების მიერ სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ის

დეგრადაციის შედეგები in vitro პირობებში..... 40

3.4.2 სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ს დეგრადაცია ***E.Coli***-ის მიერ..... 40

3.4.3 სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ს დეგრადაცია ***B.subtilis*** -ის მიერ..... 42

3.5 შედეგების შეჯამება..... 44

დასკვნა..... 46

გამოყენებული ლიტერატურა..... 47

ანოტაცია

გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმი (გმო) არის ნებისმიერი ორგანიზმი (გარდა ადამიანისა) რომლის გენეტიკური მასალა შეცვლილია გენეტიკური ინჟინერიის გზით. თანამედროვე მიდგომებით შესაძლებელი გახდა გადაილახოს სახეობათშორისი ბუნებრივი ბარიერები (ფიზიოლოგიური,რეპროდუქციული,რეკომბინანტული). გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმების წარმოებისათვის გამოიყენება ისეთი მეთოდები როგორიცაა: გენთა პირდაპირი ინექცია, მიკრო ნაწილაკებით ბომბარდირება, პატოგენური მიკროორგანიზმების გამოყენება ვექტორებად და ა.შ. გმ ორგანიზმების რაოდენობა და მათი მოხმარება ყოველწლიურად იზდება მსოფლიოს მასშტაბით და გამოიყენება სურსათის წარმოებაში, ცხოველთა საკვებში, ფარმაკოლოგიაში და სხვა სფეროებში.

გმ კულტურებიდან ყველაზე ფართოდ გავრცელებულნი არიან ჰერბიციდების მიმართ რეზისტენტული გმ მარცვლოვანი კულტურები. მათ შორის ყველაზე მეტად გავრცელებულია ჰერბიციდ „რაუნდაპ“ ტოლერანტული სოიო, რომელიც მიღებულ იქნა კომპანია „მონსანტოს“ მიერ 1995 წელს და მას 2018 წლის მონაცემებით ა.შ.შ-ს სოიოს ნათესების 94% უკავია. ა.შ.შ კი თავისმხრივ სოიოს უმსხვილესი იმპორტიორია მსოფლიოში. საქართველოს ბაზარზე წარმოდგენილი სოიოს აბსოლუტური უმრავლესობა იმპორტირებულია იმ ქვეყნებიდან, სადაც ფართოდაა გავრცელებული გენეტიკურად მოდიფიცირებული სოიოს წარმოება.

გამომდინარე გმ სოიოს ფართო გამოყენებიდან, მუდმივად ხდება მისი ნარჩენების გავრცელება გარემოში. სამწუხაროდ, საქართველოს კანონმდებლობით არ რეგულირდება გმო-ს ნარჩენების მართვა და მათი გარემოში გავრცელება უკონტროლო ხასიათს ატარებს. გარემოში მოხვედრილი გმო-ს ნარჩენები წარმოადგენს რეკომბინანტული დნმ-ის წყაროს, რომელიც პოტენციურ საფრთხეს წარმოადგენს გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერისა.

აქედან გამომდინარე, გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა გენმოდიფიცირებული სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ის დეგრადაცია სხვადასხვა მიკროორგანიზმების მიერ, კერძოდ ჩვენს მიერ შერჩეული იქნნა ***Escherichia coli*** როგორც ერთ-ეთი ყველაზე უკეთ შესწავლილი სამოდელო ორგანიზმი ბიოლოგიურ კვლევებში და ***Bacilus subtilis*** გარემოში ერთ-ერთი

ყველაზე ფართოდ გავრცელებული და უკეთ შესწავლილი მიკროორგანიზმი, რომელიც პოტენციურად მუდმივ შემხებლობაში უნდა იმყოფებოდეს გარემოში მოხვედრილ გმო ნარჩენებთან.

ტრადიციურლი და თანამედროვე ბიოტექნოლოგიური მეთოდებით მოხდა რეკომბინანტული დნმ-ის დეგრადაციის შესწავლა და გენთა ჰორიზონტალურ ტრანსფერზე დაკვირვება. კერძოდ, ჩვენს მიერ შერჩეული მიკროორგანიზმების კულტივირება მოხდა გმ სოიოს შემცველ საკვებ არეზე და მოვახდინეთ საკვებ არეში მაპროვოცირებელი ფაქტორების შეტანა (კანამიცინი, გლიფოსატი) რითიც შევქმენით სელექტიური არე და შესაძლებელი გახდა შესაძლო გენთა ჰორიზონტალურ ტრანსფერზე დაკვირვება შემდგომ ეტაპზე კი ბაქტერიული დნმ-ის ექსტრაქცია და პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით ბაქტერიული გენომის სკრინინგი გმო მარკერებზე.

ასევე ცალკე მოვახდინეთ გმ სოიოსა და არა გმ სოიოს შემცველ თხევად საკვებ არეებზე შერჩეული შტამების კულტივაცია, საიდანაც ვახდენდით სუსპენზიის ნიმუშების აღებას 24სთ-იანი ინტერვალით, 96სთ-ის განმავლობაში. აღებული ნიმუშებიდან მოვახდინეთ დნმ-ის ექსტრაქცია და შევისწავლეთ დნმ-ს დეგრადაციის ხარისხი „ჰჯრ-რეალურ დროში“-ს მეშვეობით.

ჩვენს მიერ შერჩეული მეთოდოლოგიით არ გამოვლინდა გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი გმ სოიოსა და ბაქტერიულ შტამებს შორის.

კვლევის შედეგად დადგინდა რომ განსხვავდება ბაქტერიების დნმ-ის დეგრადაციის უნარი გარემომცველ არეში. ***B.subtilis***-მა ***E.coli-თან*** შედარებით, გამოავლინა დნმ-ს დეგრადაცის მაღალი უნარი. თავის მხრივ, გმო მარკერებმაც p35S და TNOS-მაც გამოავლინა განსხვავებული მდგრადობა ბაქტერიული დეგრადაციის მიმართ.

Abstract

A genetically modified organism (gmo) is any organism whose genetical material has been altered using genetic engineering techniques. With modern approaches it is possible to overcome natural barriers (physiological, reproductive, recombinant). The methods used for genetically modified organisms are: genetically direct injection, bombardment with micro particles, use of pathogenic microorganisms as a vectors and etc. The number of Genetically modified organisms and their consumption annually increases worldwide, GMO organisms are widely used in food production, animal feed, pharmacology and other important fields.

Glyphosate tolerant soybean is the most widely distributed among GM crops that was created by "Monsanto" in 1995, and nowadays it holds 94% from total soy bean what is harvested in US. The US is the largest importer in the world of soy bean. The Georgian market is filled with food and animal feed which containing GM soybean. Because the Georgian legislation does not regulate the management of GMO waste, It permanently spreads in the environment.

The GMO waste in the environment is a recombinant DNA source which is a potential threat to the horizontal gene transfer. There is little information on the recombinant DNA degradation by terrestrial microorganisms. Because of this fact we decided to study degradation of the recombinant DNA by various microorganism. We would have chosen ***Escherichia coli*** as one of the most well-researched body organisms in biological studies, Also ***Bacilus subtilis*** as one of the most widely spread and well-studied microorganisms in the environment, which may be in permanent contact with GM waste.

The recombinand DNA degradation and horizontal gene transfer were studied by traditional and moder biotechnological methods. we cultivated chosen microorganisms on the media which contains GM soy bean. also we added as kanamycin and glyphosate as Stimulating factors. next step was extraction of DNA from this microorganisms and screening on the GMO markers p35S and TNOS.

We also separately cultivated the strains in liquid media which which contains GM soy bean In the constant shaking conditions for 96 hours. Every 24 hours we were taking the samples from bacterial media. Next step was extraction of DNA from samples and quantitative analysis of the GMO and plant markers. B.subtilis showed high levels of DNA degradation than E.coli.

we didn't detect horizontal gene transfer between GM soybean and bacteria by our methodology. The study revealed that the ability of bacteria to degradation DNA in the surrounding area is different. The different construction of DNA showed different stability against bacterial degradation

შესავალი

მას შემდგომ, რაც ადამიანმა დაიწყო შინაური ცხოველებისა და კულტურული მცენარეების მოშენება, მათი მხრიდან მუდმივად იყო მცდელობა გადაერჩიათ და გაემრავლებინათ სასურველი ნიშან-თვისებების მქონე ინდივიდები. ამგვარი სელექციით, ათასწლეულების მანძილზე, ადამიანის მიერ სელექტიურად გამოყვანილ იქნა ისეთი კულტურული ჯიშები, რომლებიც განსხვავდებოდნენ მათი ველური წინაპრებისაგან და უკეთ ქონდათ გამოხატული სასურველი ნიშან-თვისებები.

ეს პროცესი ატარებდა ინსტიქტურ ხასიათს და XX საუკუნემდე გამოთქმული ყველა მოსაზრება მემკვიდრულ ნიშანთვისებების გადაცემაზე მხოლოდ ვარაუდებს წარმოადგენდა, რომელსაც არ გააჩნდა მატერიალური მტკიცებულება. მათ შორის ანტიკური ფილოსოფოსების შრომებშიც ვხვდებით თეორიებს მემკვიდრული მასალის გადაცემასთან დაკავშირებით მაგ.: ჰიპოკრატეს და არისტოტელეს შრომებში. 1866 წელს, გრეგორ მენდელის მიერ გამოქვეყნებული ნაშრომის „ცდები მცენარეთა ჰიბრიდებზე“-ის მეშვეობით საფუძველი ჩაეყარა ბიოლოგიის ახალ დარგს გენეტიკას, რომლის მეშვეობითაც შესაძლებელი ხდებოდა იმ კანონზომიერებების დადგენა და მეცნიერული შესწავლა, რომელიც განაპირობებდა მემკვიდრული ინფორმაციის გადაცემას ერთი ინდივიდიდან შთამომავლობაში. თუმცა, გენეტიკის შექმნის ოფიციალურ თარიღად მაინც 1900 წელი მიიჩნევა [2].

დროთა განმავლობაში მეცნიერების ისეთი დარგების განვითარებასთან ერთად როგორცაა: გენეტიკა, მოლეკულური ბიოლოგია და სხვა მომიჯნავე დარგები, ჩვენთვის ცნობილი გახდა ის მატერიალური საფუძვლები, რომელიც განაპირობებს ინდივიდის ნიშანთვისებებს და მათ სტაბილურ გადაცემას მომავალ თაობებში. ამ მატერიალური საფუძვლების შესწავლამ და მეცნიერების სწრაფმა პროგრესმა, გასული საუკუნის მეორე ნახევრიდან მეცნიერებს უკვე შესაძლებლობა მისცა მანიპულაციები მოეხდინათ მოლეკულურ დონეზე და შეეცვალათ მემკვიდრული ინფორმაციის მატერიალური საფუძვლები. შესაძლებელი გახდა ბუნებრივი ბარიერების გადალახვა და გენეტიკური მასალის გადატანა არამონათესავე სახეობათა შორის, რაც მიზნად ისახავდა სასურველი ნიშანთვისებების მინიჭებას სამიზნე ორგანიზმისათვის. პირველი გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმი რომელმაც ფართო გამოყენება ჰპოვა სამედიცინო სფეროში გახლდათ თბილსისხლიანთა ნაწლავის მიკროფლორაში შემავალი ბაქტერია ***Escherichia coli***, რომელსაც ჩაშენებული აქვს ადამიანის ინსულინის გენი და მის

მიერ სინთეზირებული ინსულინი დღესდღეობით ფართოდ გამოიყენება დიაბეტით დაავადებულთა შორის.

ამ მოვლენიდან მოყოლებული არ შენელებულა საზოგადოების ყურადღება და ინტერესი ტრანსგენული ორგანიზმების მიმართ. მათ ასევე ფართო გამოყენებააქვთ მედიცინაში, ფარმაცევტულ სფეროში, სოფლის მეურნეობაში, სურსათის მრეწველობაში და სხვა მრავალ დარგში. შეიქმნა სასოფლო სამეურნეო დანიშნულების ტრანსგენული კულტურები, რომლებსაც მინიჭებული აქვთ მავნებლების, გვალვის, დაბალი ტემპერატურის მიმართ რეზისტენტობის გენები [1]. ტრანსგენული ორგანიზმების გამოჩენისთანავე მეცნიერთა აზრი ორად გაიყო, მისი მომხრეები ამბობენ რომ ესარის მომავლის ტექნოლოგაია და საშუალებას გვაძლევს გადავჭრათ უამრავი პრობლემა, რომელთა გადაჭრა ვერ ხერხდება ტრადიციული მეთოდებით. მოწინააღმდეგეთა არგუმენტებს კი ძირითადად წარმოადგენს ის, რომ ტრანსგენული ორგანიზმები საფრთხეს უქმნის ბიომრავალფეროვნებას, შეიცავს გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის საფრთხეს, ძნელად სავარაუდოა ტრანსგენული ორგანიზმის ქცევა ბუნებრივ პირობებში და რეკომბინანტული დნმ-ს ტექნოლოგია საჭიროებს დახვეწას.
„საქართველოს კანონი ცოცხალი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების შესახებ“ ცოცხალ გენმოდიფიცირებულ ორგანიზმს და გენმოდიფიცირებულ პროდუქტს განმარტავს შემდეგნაირად:

ცოცხალი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმი (შემდგომ – გენმოდიფიცირებული ორგანიზმი) – ნებისმიერი ორგანიზმი (ადამიანის გარდა), რომლის გენეტიკური მასალა შეცვლილია არაბუნებრივი (თანამედროვე ბიოტექნოლოგიური) მეთოდების გამოყენებით, რაც ნიშნავს ორგანიზმის გენეტიკური მასალის შეცვლას ხელოვნურ (ინ ვიტრო) პირობებში ნუკლეინის მჟავების ორგანიზმის უჯრედებში ან ორგანელებში პირდაპირი ინექციის მეთოდის ან/და სხვადასხვა ტაქსონომიური სტატუსის მქონე ორგანიზმების უჯრედების შერწყმის მეთოდების გამოყენებით. ეს მეთოდები საშუალებას იძლევა, გადაილახოს ბუნებრივი, ფიზიოლოგიური, რეპროდუქციული ან რეკომბინაციული ბარიერი; ამავე დროს, ისინი არ განეკუთვნება ტრადიციულ სელექციურ და ჯიშთა გამოყვანის მეთოდებს;

გენმოდიფიცირებული პროდუქტი

გენმოდიფიცირებული ორგანიზმის გადამუშავების შედეგად მიღებული ან/და გენმოდიფიცირებული ორგანიზმის ინგრედიენტის შემცველი პროდუქტი,რომელსაც ან რომლის ცალკეულ ნაწილებსაც არ აქვს გამრავლების ან/და გენეტიკური მასალის გადაცემ ის უნარი .

ამავე კანონით, საქართველოს ტერიტორიაზე აკრძალულია გენმოდიფიცირებული ორგანიზმის გარემოში ინტროდუქცია. აღნიშნული მოთხოვნის დარღვევა იწვევს პასუხისმგებლობას საქართველოს კანონმდებლობით დადგენილი წესით [3].

გენეტიკურად მოდიფიცირებული სასოფლო სამეურნეო კულტურების მოცულობა ყოველწლიურად იზრდება მსოფლიოში. მაგალითისთვის, ა.შ.შ რომელიც ლიდერია ამ კუთხით და ერთ-ერთი პიონერია გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმების წარმოების მხრივ 1997 წ.-დან 2018წ.-მდე გენმოდიფიცირებული სოიოს პროცენტული წილი 17%-დან გაიზარდა 94%-მდე, ბამბის-15%-დან 84%-მდე სიმინდის-8%-დან 80%-მდე და ა.შ. გენეტიკურად მოდიფიცირებული სოიო ერთ-ერთი წამყვანი გმ კულტურაა, რომელიც ფართოდაა წარმოდგენილი მსოფლიო ბაზარზე, მისი ძირითადი იმპორტიორი ქვეყანა ა.შ.შ, რომელმაც 2018/19 წლებში აწარმოა 123,66 მილიონი ტონა ტრანსგენული სოიო [16].

საქართველოს ბაზარი გაჯერებეულია იმპორტირებული სოიოსგან წარმოებული პროდუქციით. განსაკუთრებით, ფართოდ გამოიყენება ცხოველთა კვებაში, სადაც შედის კომპლექსური საკვების შემადგენლობაში. ვინაიდან, საქართველოს კანონმდებლობით არ რეგულირდება გმ ორგანიზმების ნარჩენბების მართვა იგი უკონტოლოდ ვრცელდება გარემოში. გარემოში მოხვედრილი ნარჩენები წარმოადგენს რეკომბინანტული დნმ-ს წყაროს რაც თავის მხრივ, შეიცავს გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის რისკს, რადგან ტრანსგენულ დნმ-ს შენარჩუნებული აქვს პრომოტორ-ტერმინატორი და შეუძლია იფუნქციონიროს სხვა ორგანიზმში. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი წარმოადგენს გენეტიკური მასალის გადაცემას არამონათესავე სახეობებს შორის.

ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, გადავწყვიტეთ შეგვესწავლა სხვადასხვა მიკროორგანიზმების მიერ ტრანსგენული სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ის დეგრადაცია,

ასევე, გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის შესაძლებლობა ტრანსგენული სოიოდან ბაქტერიებში.

ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1 რეკომბინანტული დნმ ტექნოლოგიის მოკლე ისტორია

მაშინ, როდესაც ადამიანებს წარმოდგენა არ ჰქონდათ გენეტიკაზე, მათ შეძლეს და გავლენა მოეხდინეს დნმ-ზე და შეცვალეს ის სასურველი სახეობების მისაღებად. ისინი ახდენდნენ „სელექტიურ გამრავლებას“ და „ხელოვნურ სელექციას“. აღნიშნული ტერმინები ჩარლზ დარვინმა განმარტა როგორც სასურველი ნიშანთვისების მქონე ინდივიდების გადარჩევა და გამრავლება, ადამიანის მიერ. დროის ხანგრძლივ პერიოდში ამ მიდგომის პერმანენტული გამოყენებით დნმ-ში მიიღწევა დრამატული ცვლილებები. ცოცხალი ორგანიზმები შორდებიან ველურ წინაპრებს და წარმოიქმნება ახალი სახეობები. როგორც ვარაუდობენ, ძაღლი იყო პირველი ადამიანის მიერ ხელოვნურად გამოყვანილი ორგანიზმი. დაახლოებით 32 000 წლის წინ, ჩვენი წინაპრები ჯერ კიდევ მონადირე შემგროვები იყვნენ. აღმოსავლეთ აზიაში მოხდა ველური მგლების მოშინაურება, რომლებიც მიიჩნევიან თანამედროვე ძაღლების წინაპრებად. აქედან გამომდინარე, სამართლიანია ვთქვათ, რომ ადამიანი ყოველთვის ახდენდა გარშემომყოფი ორგანიზმების გენეტიკაზე ზემოქმედებას, თუმცა ეს დროში გაწელილ პროცესს წარმოადგენდა და მიმდინარეობდა ათასწლეულების მანძილიზე, განსხვავებით გმო ტექნოლოგიისგან. გმო ტექნოლოგიაში უზარმაზარი გარღვევა მოხდა 1973 წელს, როდესაც ჰერბერტ ბოიერის და სტენლი კოენის ერთობლივი მუშაობის შემდეგ მიღებული იქნა პირველი გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმი. ამ ორმა მეცნიერმა შეიმუშავა სპეციფიკური მეთოდი, რომლის მეშვეობითაც შესაძლებელი იყო წინასწარ შერჩეული გენის „ამოჭრა“ და მისი სხვა გენით ჩანაცვლება. ამ მეთოდით მათ მოახდინეს ანტიბიოტიკორეზისტენტობის გენის იზოლაცია ერთი ბაქტერიული შტამიდან და მისი შეტანა რეციპიენტი შტამის უჯრედში. ერთი წლის შემდეგ, რუდოლფელ ჯენიშსმა და ბეატრიზ მინტზმა გამოიყენეს მსგავსი მიდგომა ვირთაგვის ემბრიონზე და შეიყვანეს მასში უცხო დნმ. მიუხედავად იმისა, რომ ეს ტექნოლოგია ხსნიდა დიდ შესაძლებლობებს მეცნიერებაში, მედიისა და ხელისუფლების წარმომადგენლებმა ასევე მეცნიერებმა დაიწყეს ფიქრი რა გავლენას იქონიებდა ეს ტექნოლოგია ადამიანის ჯანმრთელობასა და დედამიწის ეკოსისტემაზე. 1974 წელს გამოცხადდა მორატორიუმი გმ პროექტეებზე, რითიც საშუალება მიეცემოდათ ექსპერტებს ემსჯელათ ამ ტექნოლოგიის დადებით და უარყოფით მხარეებზე.

1975 წლის კონფერენციაზე მეცნიერები, იურისტები და მთავრობის წარმომადგენლები სამი დღის განმავლობაში განიხილავდნენ გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმების უსაფრთხოების საკითხებს. საბოლოოდ გადაწყდა, რომ ეს ტექნოლოგია უნდა მოექცეს გარკვეულ ჩარჩოებში და დაიცეს შესაბაამისი მითითებები რითიც იხელმძღვანელებენ ამ სფეროში მომუშავე მეცნიერები. შესაბამისად, მინიმუმამდე იქნება დაყვანილი გმო-დან მომდინარე რისკები.მთავრობები შეთანხმდნენ რომ მსოფლიოს მასშტაბით გაგრძელდებოდა ამ მიმართულებით კვლევები, რითიც დაიწყო ახალი გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმების ერა. 1980 წელს, აშშ უზენაესმა სასამართლომ მიიღო დადგენილება, რომ „ჯენერალ ელექტრიკი“-ის მეცნიერებს შეეძლოთ პატენტის მიღება გმ ბაქტერიებზე რომლებიც გამოყენება შესაძლებელი იყო ბიო რემედიაციისათვის ნიადაგში ჩაღვრილი ნედლი ნავთობის მოსაშორებლად. ორი წლის შემდეგ, 1982 წელს, ამერიკის შეერთებული შტატების სურსათისა და წამლის ადმინისტრაციამ (FDA) დაამტკიცა გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმის მიერ წარმოებული, პირველი ადამიანისათვის გამოსაყენებელი მედიკამენტი, გენეტიკურად მოდიფიცირებული ბაქტერიების მიერ წარმოებული ინსულინი და ა.შ [4].

1.2 გმო ორგანიზმებისგან მომდინარე პოტენციური საფრთხე

გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმები (გმო) ხშირად შეიცავს სხვადასხვა სახეობებიდან შეკრებილ გენთა კომპლექსებს, რათა გმო-ს მიანიჭოს განსაკუთრებული თვისებები, რომლის მიღებაც ბუნებრივი სელექციის გზით შეუძლებელია. კომერციალიზებული გმო-ის უმეტესობა შეიცავს ხუთზე ნაკლებ ცილამაკოდირებელ ტრანსგენს, როიმელიც ქმნის უნიკალურ კომბინაციას. გმო ორგანიზმებიდან გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის პოტენციური საფრთხე და მისი გავლენა ჯანმრთელობასა და გარემოზე ჯერ კიდევ არის დისკუსიის საგანი. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი არ არის მნიშვნელოვნად მიჩნეული ბევრი მეცნიერის მიერ რომლებიც მუშაობენ გენეტიკური ინჟინერიის მიმართულებით, ვინაიდან მიაჩნიათ, რომ გენები წარმოადგენს მექანიკურ ერთიან სტრუქტურას, რომელსაც შეუძლია თანაბრად იფუნქციონიროს ყელა ორგანიზმში, მიუხედავად ისტორიული და ევოლუციური კონტექსტისა. უკვე დადასტურებულია გენთა ვერტიკალური ტრანსფერი გმ მცენარეებიდან, ჩვეულებრივ კულტურულ და ველურ ფორმებზე. მიუხედავად ამისა, გმ ორგანიზმებიდან გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი არ

არის დადასტურებული ბუნებრივ პირობებში. ამის მიზეზი შეიძლება იყოს, მასპინძელი ქსოვილების/უჯრედების და რეკომბინანტული დნმ-ს ნაკლებობა ბუნებაში, პოტენციურ მასპინძელთან რეკომბინანტული დნმ-ის კონტაქტის ნაკლებობა სხვადასხვა ბუნებრივი ბარიერების გამო, ტრანსგენების შერჩევითი უპირატესობის ნაკლებობა მასპინძელი ორგანიზმებისათვის, ნიმუშების და კვლევების სიმცირე ამ მიმართულებით. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის დეტექციის მგძნობიარე მეთოდების ნაკლებობა და ა.შ [9]. მიუხედავად ამისა, ექსპერიმენტულად დადასტურებული გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი გმ მცენარეებიდან ბაქტერიებში ხელოვნურად მოდელირებულ პირობებში, სადაც დაფიქსირებულია ჰომოლოგიური გენების ტრანსფერი გმ მცენარიდან ბაქტერიებში (ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის გენი და პრომოტორი) [20; 10; 22]. ზოგიერთი შემთხვევების აღწერისას ნაჩვენებია, რომ გმ ორგანიზმს შეუძლია გაზარდოს თავისი ტრანსგენების უნარი, ჩაეშენოს და ექსპრესირდეს მასპინძელ უჯრედში იმაზე მაღალი ალბათობით ვიდრე ეს ორგანიზმებში არსებულ სხვა ბუნებრივ გენებს შეუძლიათ [9]. აქედან გამომდინარე, დღემდე მიმდინარეობს გმო-დან მომდინარე რისკებზე მსჯელობა, მათი გაანალიზება და ექსპერიმენტული კვლევა.

1.3 გმო ორგანიზმები და ბიომრავალფეროვნება

გმო ორგანიზმებიდან მომდინარე საფრთხეების ანალიზისას, უპირველეს ყოვლისა, ყურადღებას იქცევს ბუნებრივ გარემოში ინტროდუქცია. გმო მოწინააღმდეგეთა აზრით, ლაბორატორიაში in vivo პირობებში გამოყვანილი ტრანსგენული ორგანიზმის ქცევა ბუნებრივ გარემოში შეიძლება შეიცვალოს. ამასთანავე, ტრანსგენულ ორგანიზმს თანამედროვე გენეტიკური ინჟინერიის გზით მინიჭებული აქვს რიგი უპირატესობებისა მის ბუნებრივ ანალოგთან. შესაბამისად, მისი არსებობა გარემოში და გავრცელება საფრთხეს უქმნის ბიომრავალფეროვნებას და საარსებო გარემოსათვის ბრძოლაში მას გააჩნია გადამწყვეტი უპირატესობები ბუნებაში არსებულ არარეკომბინანტულ ფორმებთან, შესაბამისად მაღალია იმის ალბათობა, რომ ლოკალურად სადაც გავრცელებულია გმ ორგანიზმები გაქრეს მისი ბუნებაში გავარცელებული არარეკომბინანტული ფორმები. ასევე მაღალია ტრანსგენების გაჟონვის ალბათობა მოანთესავე სახეობებში. მაგალითად, გმ მცენარეებიდან შესაძლებელია ტრანსგენები გავრცელდეს დამტვერვით მის არაგენმოდიფიცირებულ სახეობებში. ჰერბიციდ ტოლერანტულ გმ მცენარეებს ვინაიდან

გააჩნიათ მდგრადობა ჰერბიციდებისადმი, შესაძლებელია ჰერბიციდ ის მაღალი კონცენტრაციით გამოიყენება, უკეთესი ეფექტის მისაღწევად. რაც ერთის მხრივ იწვევს „სუპერ სარეველების“ წარმოქმნას რომლებსაც ბუნებრივად უჩნდებათ რეზისტენტობა ჰერბიციდის მიმართ და მეორეს მხრივ ცვლის ნიადაგის მიკროფლორის შემადგენლობას, აზიანებს ნიადაგის ნაყოფიერ ფენებს.

1.4 გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი

ორგანიზმში გენეტიკური ინფორმაციის მატერიალურ საფუძველს წარმოადგენს დეზოქსირიბონუკლეინის მჟავები (დნმ). დნმ ჩვეულებრივ მომავალ თაობებს გადაეცემათ ორგანიზმის რეპროდუქციული გზით (სექსუალური რეპროდუქცია და ა.შ). გენეტიკური მასალის ვერტიკალური გადაცემა წარმოადგენს ნორმალურ მოვლენას ბუნებაში, რომლის მეშვეობითაც ვრცელდება დნმ-ის ძირითადი ნაწილი მომავალ თაობებში, თუმცა იშვიათად დნმ-ს ახასიათებს გავრცელება არამონათსავე სახეობებს შორის. ამ პროცესს გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი ეწოდება. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი წარმოადგენს გენეტიკური მასალის სტაბილურ გადაცემას ერთი ორგანიზმიდან მეორეში არარეპროდუქციული გზით, ადამიანის ჩარევის გარეშე. აღნიშნული პროცესი მიმდინარეობს როგორც მონათესავე სახეობებში, ასევე ერთმანეთისგან ევოლუციურად შორს მდგომ სახობებში (ვირუსაა და ცხოველს შორის; მცენარესა და ბაქტერიას შორის). გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის დროს დონორი ორგანიზმის გენეტიკური მასალა გადალახავს რეციპიენტის უჯრედულ ბარიერებს და ერწყმის მასპინძელი ორგანიზმის გენეტიკურ მასალას. ეს პროცესი ატარებს ერთჯერად ხასიათს დნმ-ის შეზღუდული რაოდენობის გადატანით. დნმ-ანაბეჭდის მეშვეობით გამოვლენილია ევოლუციის მანძილზე მომხდარი ბევრი გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის კვალი. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის მაგალითებია გენური თერაპია ადამიანებში, ***Agrobacterium***-ით მცენარეების ინფიცირება და ანტიბიოტიკო რეზისტენტულობის გავრცელება ბაქტერიებში, რომელიც პირველად საზოგადოების ყურადღრების ქვეშ მოექცა 1970-იან წლებში. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის აღმოჩენა შეგვიძლია დავუკავშიროთ ფ.გრიფიტის ცდას 1928წ. მან აღწერა ბაქტერიებში გენეტიკური მასალის ტრასნფერი მკვდარი ვირულენტური ფორმიდად არავირულეტურ ფორმაში, რომელის შემდგომაც ამ უკანასკნელმა შეიძინა ვირულენტული ფორმა. საქმე ეხებოდა პნევმონიის გამომწვევ მიკროორგანიზმის

Streptococcus pneumoniae-ს ორ შტამს. ეს პროცესი მის მიერ აღწერილი იქნა როგორ ტრანსფორმაცია. 1946 წლამდე არ იყო აღწერილი სხვა სახის არარეპროტუქციული გენთა ტრანსფერი ორ ორგანიზმს შორის. ხოლო შემგომ იდენტიფიცირებული და აღწერილი იქნა სხვადასხვა ტიპის გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი: კონიუგაცია, ტრანსფორმაცია, ტრანსდუქცია, რეკომბინბაცია და ა.შ. ეს პროცესები 1980 წლიდან ცნობილია ერთად როგორც გენთა ჰორიზონტალური ან გენთა ლატერალური ტრანსფერი [15; 21].

1.5 თავისუფალი რეკომბინანტული დნმ-ის მდგრადობა გარემოში

გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმების გავრცელება და მათი რიცხოვნობა განსაკუთრებით სწრაფად იზრდება მსოფლიოში. ბუნებაში არსებული გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმები და მისგან წარმოებული პროდუქტები წარმოადგენს რეკომბინანტული დნმ-ის წყაროს. დნმ-ის გამონთავისუფლება გარემოში გმო-იდან არ ატარებს სპეციფიკურ ხასიათს და მიმდინარეობს ისევე როგორც ჩვეულებრიც ორგანიზმმებში. ცოცხალი ორგანიზმები არსებული დნმ წარმოადგენს დიდი ზომის პოლიმერულ მოლეკულას მოლეკულას, უმაღლეს ორგანიზმებში დნმ განიცდის ფრაგმენტაციას უჯრედის კონტროლირებული კვდომის შემთხვევაში (აპოპტოზი). დნმ-ის თვით დეგრადაცია მკვდარ უჯრედებში წარმოადგენს კომპლექსურ პროცესს დამოკიდებულია სახეობის ფიზიოლოგიაზე და წარმოადგენს დროში გაწელილ პროცესს რა დროსაც დნმ-ის დიდი ნაწილი მაინც გამონთავისუფლდება გარემოში. ერთუჯრედიანი ორგანიზმების შემთხვევაში გამონთავისუფლებული დნმ-ის უტილიზაციას ახდენენ მეზობელი უჯრედები სპეციფიკური ფერმენტების ნუკლეაზების მეშვეობით [15; 21]. თავისუფალი დნმ წარმოდგენილია ნიადაგში, ზღვის წყალში და ა.შ ნიადაგის 1 გრამი ნიმუშიდან შესაძლებელია 80მკგ დნმ-ს იზოლაცია [5], საიდანაც 1მკგ-მდე წარმოდგენილია თვისუფალი დნმ-ს სახით. თავისუფალი დნმ გარემოში შესაძლებელია დარჩენს საკმაოდ დიდხანს, ის ძირითადად დეგრადირდება გარემოში არსებული ნუკლეაზებით, ფიზიკური და ქიმიური აგენტების მოქმედებით, თუმცა მას შესწევს უნარი ადბსორბცირდეს ნიადაგში არსებულ სედიმენტებზე როგორებიცაა: კვარცი, მინდვრის შპატი,და თიხის მინერალები. ადბსორბცირებული დნმ გაცილებით დიდხანს ძლებს გარემოში და მდგრადია ნუკლეაზური მოქმედებისადმი [13]. გმ თამბაქოს გენტამიცინის მიმართ რეზისტენტობის გენები აღმოჩენილი იქნა 1 წლის შემდეგ ნიადაგში პჯრ ჰიბრიდიზაციის მეთოდით, ასევე ექპერიმენტი ჩატარდა ტრანსაგენული შაქრის ჭარხალზე რომლელიც შეიცავდა კანამიცინის

მიმართ რეზისტენტობის გენებს სუფთა რეკომბინანტული დნმ-ის მოთავსების შემდეგ ნიადაგში გმო მარკერების აღმოჩენა შესაძლებელი იყო 6 თვის განმავლობაში, ხოლო იმ ნაკვეთზე სადაც მოყვანილი იქნა ტრანსგენული ჭარხალი 2 წლის მანძილზე [14; 18].

1.6 ჰერბიციდ „რაუნდაპ“ ტოლერანტული სოიო (RR soybean)

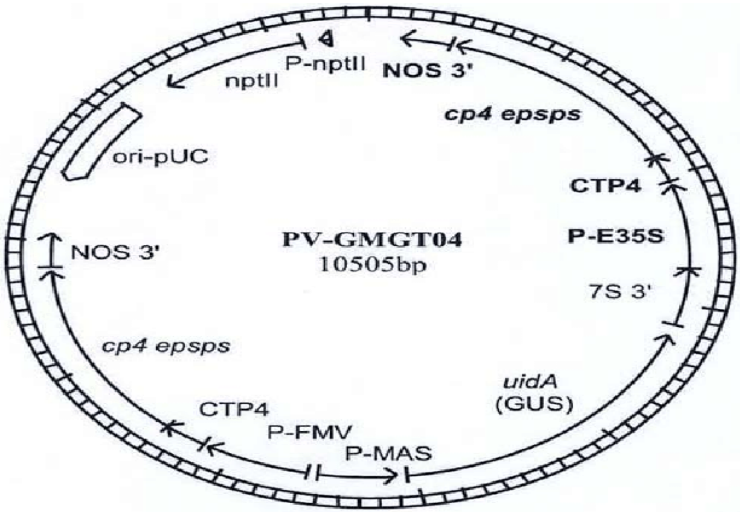
ტრანსგენული ორგანიზმებიდან ყველაზე ფართოდ გავრცელებულია ტრანსგენული მარცვლოვანი კულტურები მათ შორის კი ყველაზე მოცულობითი წილით წამოდგენილია ჰერბიციდ „რაუნდაპ“ ტოლერანტული სოიო, რომლის ჯამურმა რაოდენობამ ა.შ.შ-ში 2018/19 წლებში 123,66 მილიონ ტონას მიაღწია. რაუნდაპ ტოლერანტული სოიო GTS 40-3-2 შემუშვებული იქნა კომპანია „მონსანტოს“ მიერ მიკრო ნაწილაკებით ბომბარდირების მეთოდით. სოიოში მოდიფიცირებულია ფერმენტ **EPSPS**(5-ენოლპირუვშიკიმატე-3-ფოსფატაზა)-ის მაკოდირებელი გენი, რომელიც ჩანაცვლებულია მუტანტური ვარიანტით. მუნტანტური გენი იზოლირებულ იქნა ***Agrobacterium tumefaciens*** შტამი **CP4**-დან. გენი იმყოფება ძლიერი კონსტიტუციური პრომოტორის **P- CaMV E35S-**ის კონტროლის ქვეშ რომელიც იზოლირებულია ყვავილოვანი კომბოსტოს მოზაიკური ვირუსიდან და ბოლოვდება **T-nos-**ს ტერმინატორით. გენში ასევე ჩასმულია ქლოროპლასტული სატრანსპორტო პეპტიდის მაკოდირებელი გენი **CTP4,** რომელიც იზოლირებულია მცენარე პეტუინიადან. სასიგნალო პეპტიდი ხელს უწყობს ახლადასინთეზირებული **EPSPS** ფერმენტის ქლოროპლასტებში ტრანსპორტირებას სადაც შიკიმატეს რეაქციები და გლიფოსატის მოქმედების არეალია. გმ სოიო შეიცავს რეკომბინანტული დნმ-ს შემდეგ თანმიმდევრობას **P-E35S*CP4*EPSPS*T- CTP4 nos.**

ჰერბიციდ რაუნდაპის აქტიურ კომპონენტს წარმოადგენს გლიფოსატი, რომელიც ადვილად გადაადგილდება მცენარეში და სპეციფიკურად ბლოკავს **EPSPS-**ფერმენტს შიკიმატეს რეაქციებში. შიკიმატეს რეაქციები გვხვდება როგორც მცენარეებში, ასევე მიკროორგანიზმებში მისი ფუნქციაა არომატული ამინომჟავების წარმოქმნა. ფერმენტი სპეციფიურია და აკატალიზირებს რეაქციების ერთ ეტაპს. მცენარეში მოხვედირილი გლიფოსატი ბლოკავს არომატული ამინომჟავების წარომქმნას რომლებიც აუცილებელია მცენარის ნორმალური ფუნქციონირებისათვის..

გენმოდიფიცირების მეთოდი

გმ სოიოს მიღება მოხდა ოქროს მიკრონაწილაკებით ბომბარდირებით რომელზეც ადსორცირებული იყო პლაზმიდა **PV-GMGT04** (ფოტო N1). პლაზმიდური ვექტორის ამფლიპიიცირებისათვის გამოყენებული იქნა ***Escherichia coli***. პლაზმიდა გარდა სამიზნე გენისა და პრომოტორ ტერმინატორისა ასევე შეიცავს ბეტა გლუკურონიდაზის როგორც სელექტიური მარკერის და ანტიბიოტიკ კანამიცინის რეზისტენტობის გენს **nptII**-ს[17; 23].

ფოტო N1



1.7 ბაქტერიული უჯრედების ტრანსფორმაცია

ბუნებრივ პირობებში ბაქტერიებს გენეტიკური ინფორმაციის გაცვლის სამი გზა გააჩნიათ:

კონიუგაცია კონიუგაციისას გენეტიკური მასალის გაცვლა ხდება ორ უჯრედს შორის დროებითი კავშირის წარმოქნისას. ამ დროს დონორ და რეციპიენტ უჯრედს შორის მყარდება კავშირი სპეციალური ბაქტერიული წარმონაქმნებით პილებით. რომლის მეშვეობითაც ხდება გენეტიკური ინფორმაციის გადასვლა ერთი უჯრედიდან მეორეში. კონიუგაცია გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის ყველაზე გავრცელებული გზაა რომელსაც უკავშირდება ანტიბიოტიკორეზისტენტულობის გავრცელება ბაქტერიებში. კონიუგაციის პროცესი პირველად აღწერილი იქნა ***E.coli***-ს მაგალითზე

ტრანსდუქცია, ტრანსდუქციისას გენეტიკური მასალის გადატანას ერთი უჯრედიდან მეორეში ანხორციელებს ბაქტერიოფაგი. მასპინძელ უჯრედში ახლად დასინთეზირებული ვირუსული გენომი ზოგჯერ „შეცდომით“ გააიყოლებს ბაქტერიული გენების ნაწილს რომელიც შემდგომ ჩაეშენება ბაქტერიოფაგის სხვა მასპინძელში მისი ინფიცირებისას.

ტრანსფორმაცია ამ პროცესში ადგილი აქვს გარემოში არსებული თავისუფალი დნმ-ის შესვლას რეციპიენტის ციტოზოლში და მის ჩართვას გენომში. ბუნებრივ პირობებში უმეტეს შემთხვევაში ტრანსფორმაციისას ბაქტერიების მიერ შეთვისებული გენების წყაროს წარმოადგენს იგივე ან მონათესავე სახეობები, თუმცა პოტენციურად შესაძლებელია არამონათესავე სახეობების გენების ჩართვაც (მაგ. მცენარეული ბაქტერიაში) მიკროორგანიზმების ზოგიერთი სახეობები ბუნებრივად მუდმივად კომპეტეტურია (***Neisseria gonorrhoeae)*** ან ბაქტერიული კულტურის ციკლის რომელიმე ფაზაში მაგ. ***B.subtilis***. კომპეტენტური ხდება როდესაც კულტურა გადადის ლოგ ფაზიდან სტაციონალურ ფაზაში [12].უჯრედის კომპეტენტურობა ნიშნავს უჯრედის მზადყოფნას მიიღოს ახალი გენეტიკური მასალა უჯრედგარე სივრციდან მოახდინოს მისი ტრანსპორტირება უჯრედში ინტეგრაცია გენომში და შემდგომ ექსპრესია. ტრანსდუქციისგან და კონიუგაციისგან განსხვავებით ბუნებრივი ტრანსფორმაცია უფრო სენსიტიური პროცესია ვინაიდან მიმდინარეობს თავისუფალი დნმ-ის შეთვისება გარემოდან შესაძლოა მოხდეს დნმ-ის ნუკლეაზებით დეგრადაცია. უჯრედის კომპეტენტურობაზე პასუხისმგებელია com-გენები [9]. ბაქტერიების ეს თვისება კარგადაა გამოყენებული გენეტიკურად მოდიფიცირებული ბაქტერიების მიღბის პროცესში როდესაც კომპეტენტურ ბაქტერიებში შეჰყავთ არეში არსებული პლაზმიდები. ხელოვნურად, კომპეტენტური უჯრედების მიღების რამოდენიმე გზა არსებობს ეს შეიძლება იყოს

ელექტროფორაცია- როდესაც კულტურალურ არეში ხდება მაღალი ძაბვის იმპულსების გატარება, შედეგაგდ ბაქტერიული უჯრდის კედელში ჩნდება ფორები საიდანაც უჯრედში აღწევს არეში არსებული პლაზმიდა.

Ca^{+}-ის იონებით დამუშავება- Ca^{+} იონების გარკვეული კონცენტრაცია და შესაბამისი პირობების შექმნა როგორიცაა: ტემპერატურული რეჟიმი და ა.შ იწვევს ბაქტერიული კედლის ფორაციას და ადვილი ხდება მასში არსებული დნმ-ის ფრაგმენტის ან პლაზმიდის გადატანა [19].

1.8 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ) რეალურ დროში

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (**Real-Time PCR**) ასევე ცნობილია როგორც რაოდენობრივი პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (რ-პჯრ). წარმოადგენს მოლეკულური ბიოლოგიის მეთოდს, რომელიც ეფუძნება in vitro პირობებში მოვახდინოთ დნმ-ის მოკლე უბნების მრავალჯერადი ამფლიპიკაცია. მეთოდი საშუალებას გვაძლევს დაკვირვება ვაწარმოოთ სამიზნე დნმ-ის ამფლიპიკაციაზე პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროცესში და ასევე მივიღოთ ინფორმაცია დნმ-ს სამიზნე უბნების რაოდენობრივ მახასიაღტებლებზე. პჯრ რეალურ დროში შესაძლებელია გამოვიყენოთ სამიზე დნმ-ის უბნის როგორც თვისობრივი ასევე რაოდენობრივი იდენტიფიკაციისათვის. რაც განასხვავებს მას ჩვეულებრივი პჯრ-ისაგან, ტრადიციული პჯრ არიძლევა საშუალებას მოხდეს სამიზნე დნმ-ის რაოდენობრივი განსაზღვრა ნიმუშში, ასევე შეუძლებელია რეაქციის მსვლელობისას ამპლიფიკაციის პროცესზე დაკვირვება.

როგორც სტაანდარტულ პჯრ-ში პროცესები აქაც სამ ეტაპად მიმდინარეობს:

დენატურაცია - ციკლის ამ ეტაპზე უნდა გახორციელდეს სარეაქციო არეში

არსებული დნმ-ის ორმაგი ჯაჭვის დაცალკევება.

ანელინგი - ანელინგის სტადიაზე ხდება პირველ სტადიაზე მიღებული დნმ-ს

ერთმაგ ჯაჭვებთან პრაიმერების დაკავშირება.

ელონგაცია - კომპლემენტარულად

დაკავშირებული პრაიმერებიდან დაწყებული, დნმ-ს ჯაჭვი კომპლემენტარული

დაგრძელება, რომელიც მიმდინარეობს 5’ 3’ ბოლოს მიმართულებით.

სტანდარტულ პჯრ-თან შედარებით სარეაქციო არეში პჯრ-რეალურ დროში-ს დამატებულიაქ რამოდენიმე კომპონენტი. ესენია ფლუორესცენტულ საღებავები და UNG/UDG

UDG-Uracil-DNAglycosylases

UDG-uracil-N-glycosylase

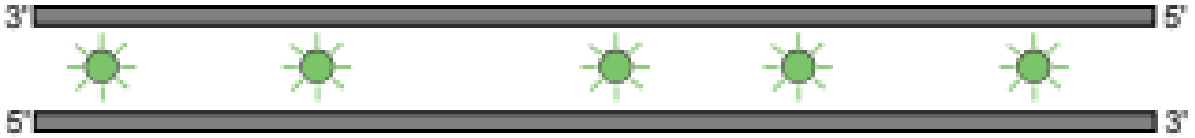
ფერმენტები სარეაქციო არეში დამატებულია დნმ-ის ურაცილით კონტამინაციის თვიდან

ასაცილებლად, ამ ოჯახის ფერმენტები განაპირობებენ ურაცილის ჰიდროლიზს N-გლიკოლიზური ბმების დაშლით ურაცილსა და შაქარს შორის. დნმ-ის ურაცილით კონტამინაცია ხშირად იწვევს მცდარ პოზიტიურ შედეგებს. ეს ფერმენტები სხვა სახის გავლენას არ ახდენენ პჯრ-ის მსვლელობაზე

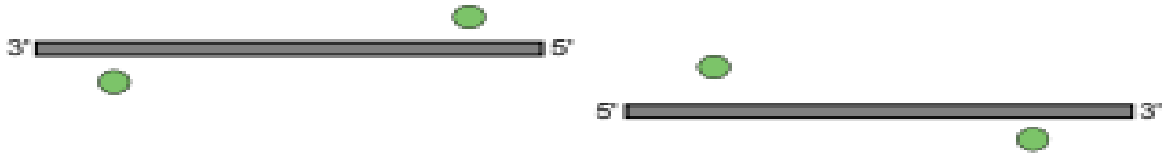
პჯრ-რეალურ დროში გამოყენებული საღებავების ნათების ინტენსივობა დამოკიდებულია სარეაქციო არეში არსებული საძიებო დნმ-ის უბნების რაოდენობაზე. რაც ინფორმაციას გვაწვდის საძიებო უბნის მეთოდში ძირითადად გამოიყენება ორი ტიპის საღებავი:

1. არასპეციფიკური ფლუორესცენტული საღებავი, ამ ტიპის საღებავები უკავშირდება ნებისმიერ ორჯაჭვიან დნმ-ს რომელიც წარმოიქმნება სარეაქციო არეში და გვაძლევს ნათებას, რომელიც აისახება დეტექტორზე. ნათების ინტესივობა გვაძლევს ინფორმაციას ორჯაჭვიანი დნმ-ის რაონებობაზე არეში შესაბამისად თუ ნიმუშში გვაქვს დნმ-ს საძიებო უბანი ის იწყებს ამფლიპიკაციას და ნათების ინტენსივობა დროში იზრდება(ფოტოN2), ხოლო ერთჯაჭვიანი დნმ-ს შემთხვევაში ნათებას არ გვაძლევს (ფოტოN3)

ფოტოN2



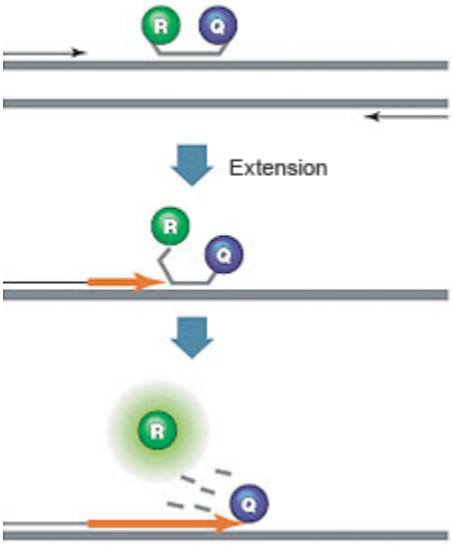
ფოტოN3



ასეთი სახის საღებავის გამოყენება შედარებით არაზუსტია, ვინაიდან შესაძლოა ამფლიპიკაციის პროცესში წარმოიქმნას არასპეციფიკური ორჯაჭვიანი დნმ-ის მოლეკულები რომლებიც ცრუ დადებით პასუხს მოგვცემს.

2. მეორე ტიპის საღებავი დატანილია მცირე ზომის დნმ-ს თანმიმდევრობაზე, რომელიც კომპლემენტარულად შეეესაბამება საძიებო უბნის მცირე მონაკვეთს. ასეთ მოლეკულებს ზონდები ეწოდებათ. ამფლიპიკაციის პროცესში ზონდი უკავშირდება საძიებო დნმ-ის ნაწილს კომპლემნენტარულად. ზონდის ერთ ბოლოზე დამაგრებულია ფლუორესცენტული საღებავი ზოლო მეორე ბოლოზე საღებავის ჩამხშობი. როდესაც დნმ-ს ერთჯაჭვზე იწყება დაკავშირებული პრაიმერიდა შვილეული ჯაჭვის ელონგაცია და მიაღწევს ზონდამდე ხდება მისი დაშლა, შედეგად ცალცალკე გამონთავისუფლდება ფლუორესცენტული საღებავი და მისი ჩამხშობი, ვინაიდან მათ შორის მანძილი იზრდება ჩამხშობი ვეღარ ახერხებს საღებავის ნათების ჩახშობას. აქედან გამომდინარე, რაც უფრო მეტია საძიებო უბნის რაოდენობა სარეაქციო არეში მით მეტი საღებავია გამონთავისუფლებული შესაბამისად მეტია ნათების ინტესივობა და საშუალება გვაქვს დავადგინოთ ნიმუშში დნმ-ის საძიებო უბნის რაოდენობა(ფოტო N4)

ფოტო N4



2. მეთოდები

2. აქტიური შტამების სკრინინგის მეთოდიკა

2.1 საკვლევი შტამები:

ექსპერიმენტი განხორციელდა ***E.coli ATCC 8739*** და ***B.subtilis ATCC 6633*** შტამებზე

E.coli წარმოადგენს გრამ უარყოფით ჩხირისებრ აერობულ ბაქტერიას, რომელიც ფართოდ გავრცელებულია თბილსისხლიანთა ნაწლავის მიკროფლორაში, ჩვენს მიერ ექსპერიმენტისათვის შერჩეული იქნა როგორც ერთ-ერთი ყველაზე კარგად შესწავლილი სამოდელო ორგანიზმი.

B.subtilis წარმოადგენს გრამ დადებით სპორაწარმომქმნელ აერობულ ჩხირისებრ ბაქტერიას, ექსპერიმენტისათვის შერჩეულ იქნა როგორც ერთ-ერთი კარგად შესწავლილი და ფართოდ გავრცელებული ნიადაგის მიკროორგანიზმი. ***B.subtilis*** ასევე მიეკუთვნება იმ მიკროორგანიზმთა ჯგუფს რომელიც განიცდის ტრანსფორმაციას ბუნებრივ პირობებში.

საკოლექციო შტამების კულტივირებას ვახდენდით " TSY" აგარზე(მომზადება მომწოდებლის ინსტრუქციისამებრ).

შტამები მოწოდებული იქნა შ.პ.ს "ხარისხის ლაბორატორის" მიერ.

2.2 საკვები არეები

ექპერიმეტისათვის ჩვენს მიერ შერჩეული იქნა შემდეგი თხევადი საკვები არეები:

2.2.1 გამოვიყენეთ არაგენმოდიფიცირებული სოიოს 2% ექსტრაქტი და სტანდარტული ბაქტერიოლოგიური საკვები არე "ბუფერ პეპტონიანი წყალი" თანაფარდობით 1:1

2.2.2 გამოვიყენეთ გენმოდიფიცირებული სოიოს (Roundup ready) 2% ექსტრაქტი და სტანდარტული ბაქტერიოლოგიური საკვები არე "ბუფერ ბებტონიოანი წყალი" თანაფარდობით 1:1

არაგენმოდიფიცირებული სოიოს ექსტრაქტს ვამზადებდით შემდეგნაირად: დაფქვილი სოიო შეგვქონდა გამოხდილ წყალში 2%-ის ოდენობით (2გ 100მლ-ში) რის

შემდეგაც გადიოდა თრმულ დამუშავებას (121 ◦ C -ზე 20 წთ-ის განმავლობაში 1ატმ, წნევის პირობებში), ბინტის მეშვეობით ხდებოდა სუსპენზიის ფილტრაცია და მყარი ფრაქციის მოშორება. ფილტრატს ვიყენებდით ბაქტერიოლოგიური საკვები არის მოსამზადებლად.

გენმოდიფიცირებული სოიოს 2% ექსტრაქტს ვამზადებდით შემდეგნაირად: გენმოდიფიცირებული სოიოს "შროტი" შეგვქონდა გამოხდილ წყალში 2%-ის ოდენობით (2გ 100მლ-ში) რის შემდეგაც გადიოდა თერმულ დამუშავებას (121 ◦ C -ზე 20 წთ-ის განმავლობაში 1ატმ წნევის პირობებში), ბინტის მეშვეობით ხდებოდა სუსპენზიის ფილტრაცია და მყარი ფრაქციის მოშორება. ფილტრატს ვიყენებდით ბაქტერიოლოგიური საკვები არის მოსამზადებლად.

ჩვენს მიერ გამოყენებული იქნა კომპანია "biolife"-მიერ წარმოებული სტანდარტული საკვები არე "ბუფერ პეპტონიანი წყალი"

შემდეგი შემადგენლობით გ/ლ

- 10გ პეპტონი
- 5გ ნატრიუმის ქლორიდი
- 3,5გ დინატრიუმის ჰიდროფოსფატის ანჰიდრიდი
- 1,5 მონოკალიუმის ფოსფატი

არის მომზადება ხდებოდა მწარმოებლის ინსტრუქციის მიხედვით

ჩვენს მიერ მომზადებული ბაქტერიოლოგიური საკვები არეები ინოკულირებამდე სტერილიზაციას გადიოდა 121 ◦C -ზე 15 წთ-ის განმავლობაში 1ატმ წნევის ქვეშ.

ექსპერიმენტი მიმდინარეობდა ორი მიმართულებით:

2.3.1 ჰერბიციდ გლიფოსატის ფონზე, გლიფოსატ რეზისტენტული გენეტიკური კონსტრუქციის გამოყენების სტიმულაცია

პირველ ეტაპზე ემპირიულად დადგენილი იქნა გლიფოსატის ლეტალური და სუბლეტალური კონცენტრაციები როგორც E.coli-ის ასევე B.subtilis-ისათვის. გამოვიყენეთ ორობითი განზავებების მეთოდი. ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმების ზრდას ვაკვირდებოდით ვიზუალურად. სუბლეტალურ დოზად ჩვენს მიერ მიჩნეული იქნა ყველაზე

მაღალი კონცენტრაცია რომლის პირობებშიც შეინიშნებოდა ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმების თვალხილული ზრდა თხევად საკვებ არეში.

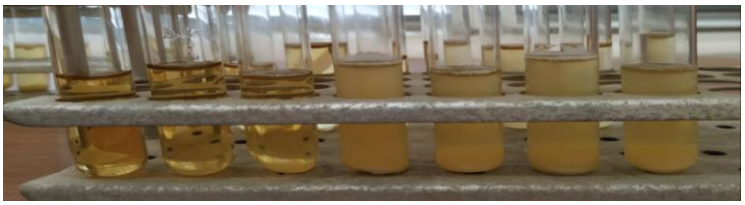
ჩვენს მიერ ექსპერიმენტული ჯგუფისათვის გამოყენებული იქნა გენმოდიფიცირებული სოიოს შემცველი საკვები თხევადი საკვები არე (2.2.2.), რომელშიც წარმოდგენილი იყო ჰერბიციდ გლიფოსატისადმი რეზისტენტულობის გენეტიკური კონსტრუქცია.

საკონტროლო ჯგუფისათვის გამოვიყენეთ არაგენმოდიფიცირებული სოიოს შემცველი საკვები არე (2.2.1.) სადაც გლიფოსატისადმი რეზისტენტობის გენეტიკური კონსტრუქცია არ იყო წარმოდგენილი საკვებ არეში. რითიც საშუალება მოგვეცა დაკვირვება მოგვეხდინა ექსპერიმენტულ მიკროორგანიზმებში რეზისტენტობის გაჩენისას, იგი სავარაუდოდ გამოწვეული იყო გლიფოსატ რეზისტეტნული გენეტიკური კონსტრუქციის გამოყენებით, ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმების მიერ თუ ბუნებრივი "შეგუების" გზით.

საკვებ არეში არსებული გლიფოსატისადმი რეზისტენტობის გენეტიკური კონსტრუქციის გამოყენების სტიმულაციის მიზნით ჩვენს მიერ საკვებ არეში ხდებოდა გლიფოსატის შეტანა სუბლეტალური კონცენტრაციებით. დოზების გაანგარიშებას ვახდენდით ზღვრული განზავებების მეთოდით. მაქსიმალური კონცენტრაციიდან, რომელზეც ჯერ კიდევ შეინიშნებოდა ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმების თვალიხილული ზრდა(ფოტო N5), "შეგუებული" მიკროორგანიზმების გადათესვას ვახდენდით ერთი ბიჯით უფრო მაღალი კონცენტრაციის შემცველ არეზე (იხ.სქემა N1) მანამ, სანამ მიღწეული არიქნა ის მაქსიმალური კონცენტრაცია, რომლის ზემოთაც ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმები ვეღარ ახერხებდნენ შეგუებას.

ჩვენს მიერ გამოყენებული იქნა კომპანია "syngenta"-ს მიერ წარმოებული ჰერბიციდი კომერციული დასახელებით "ურაგან ფორტე", რომლის აქტიურ კომპონენტს წარმოადგენს გლიფოსატი 500გ/ლ

ფოტო N5

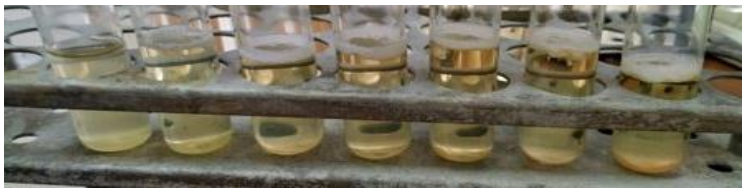


2.3.2 **ანტიბიოტიკ კანამიცინის ფონზე, კანამიცინისადმი რეზისტენტული გენეტიკური კონსტრუქციის გამოყენების სტიმულაცია**

ცნობილია, რომ უჯრედების ტრანსფორმაციისას სამიზნე გენებთან ერთად გამოიყენება მარკერული გენები რომლებიც, საშუალებას იძლევა მოხდეს ტრანსფორმირებული უჯრედების გადარჩევა არატრანსფორმირებლისაგან. უმეტესად გამოიყენება სხვადასხვა ანტიბიოტიკებისადმი მდგრადობის გენები. რაუნდაპის მიმართ ტოლერანტული სოიოს შემთხვევაში მარკერულ გენებათ გამოყენებული იქნა კანამიცინისა და ნეომიცინის რეზისტენტობის გენები. შესაბამისად, გმო სოიოს შემცველ საკვებ არეში წარმოდგენილი იყო როგორც გლიფოსატის მიმართ მდგრადობის ასევე კანამიცინისა და ნეომიცინის მიმართ მდგრადობის გენები.

ისევე როგორც გლიფოსატის შემთვევაში ექსპერიმენტის პირველ ეტაპზე ჩვენს მიერ დადგენილი იქნა E.coli და B.subtilis-სათვის კანამიცინის ლეტალური დოზები ბაქტერიების ზრდაზე ვიზუალური დაკვირვების მეშვეობით (ფოტო N6).

ფოტო N6



ექსპერიმენტული ჯგუფისათვის გამოყენებული იქნა გენმოდიფიცირებული სოიოს შემცველი ბაქტერიოლოგიურის საკვები არე (2.2.2)

საკონტროლო ჯგუფის კულტივირება კი მიმდინარეობდა არაგენმოდიფიცირებული სოიოს შემცველ ბაქტერიოლოგიურ საკვებ არეზე (2.2.1.)

კანამიცინისადმი რეზისტენტული გენეტიკური კონსტრუქციის გამოყენების სტიმულაციის მიზნით ჩვენს მიერ საკვებ არეში შეტანილი იქნა კანამიცინის სუბლეტალური დოზები. დოზების გაანგარიშებას ვახდენდით ზღვრული განზავებების მეთოდით. მაქსიმალური კონცენტრაციიდან რომელზეც ჯერ კიდევ შეინიშნებოდა ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმების თვალიხილული ზრდა (ფოტო N5), “შეგუებული” მიკროორგანიზმების გადათსვას ვახდენდით ერთი ბიჯით უფრო მაღალი კონცენტრაციის შემცველ არეზე (სქემა N1) მანამ სანამ მიღწეული არიქნა ის მაქსიმალური კონცენტრაცია რომლის ზემოთაც ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმები ვეღარ ახერხებდნენ შეგუებას.

ჩვენს მიერ გამოყენებული იქნა ფარმაცევტული დანიშნულების საინექციო ფხვნილი „კანამიცინი“ რომლის აქტიურ კომპონენტს წარმოადგენს კანამიცინ-A 98%

2.3.3 **არეში არსებული რეკომბინანტული დნმ-ისგან ბაქტერიული კულტურის გასუფთვება**

როგორც გლიფოსატის, ასევე კანამიცინის ფონზე არსებულ ექპერიმენტულ ჯგუფებში მაქსიმალური კონცენტრაციების მიღწევის შემდეგ, რის შემდეგაც ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმები ვეღარ ახერხებდნენ უფრო მაღალი კონცენტრაციების დაძლევას, ჩვენ მოვახდინეთ მათი კუტივირება მყარ საკვებ არეზე და რამოდენიმეჯერადი გადათესვა, თხევად ბაქტერიოლოგიურ საკვებ არეში არსებული რეკომბინანტული დნმ-ისაგან გასუფთავების მიზნით. მყარ საკვებ არედ გამოვიყენეთ არაგენმოდიფიცირებული სოიოს შემცველი საკვები არე(2.2.1), რომლის გამყარებაც მოვახდინეთ აგარის ექსტრაქტით (2%). კანამიცინისა და გლიფოსატის კონცენტრაცია მყარ არეებში შევინარჩუნეთ იმ მაქსიმალურ ნიშნულზე რომელზეც „შეგუებულ“ შტამებს შეეძლოთ გამრავლება. სუფთა შტამები რომლებიც უჯრედგარე სივრცეში არ შეიცავდნენ რეკომბინანტულ დნმ-ს გამოყენებული იქნა ბაქტერიული დნმ-ის ექსტრაქციისთვის და შემგომში პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით კვლევისათვის.

2.3.4 **ინკუბაციის პირობები**

ინკუბაცია მიმდინარეობდა თხევად საკვებ არეში, ნჯღრევის გარეშე ბუნებრივი აერაციის პირობებში 37C-ზე . აღრიცხვას ვახდენდით 24სთ-ში ერთხელ.

2.4.1 **მიკროორგანიზმების მიერ სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ის დეგრადაციის შესწავლა in vitro პირობებში**.

ჩვენს მიერ ექსპერიმენტისათვის შერჩეული შტამების კულტივირება მოვახდინეთ თხევად საკვებ არეებზე როგორც გმ სოიოს შემცველ(2.2.2), ასევე არაგენმოდიფიცირებული სოიოს შემცველ საკვებ არეზე(2.2.1) 96 სთ-ის განმავლობაში. ბაქტერიული საკვები არედან ვახდენდით ბაქტერიული სუსპენზიის აღებას 24სთ-ის ინტერვალით, აღბული ნიმუშებიდან მოვახდინეთ დნმ-ის ექსტრაქცია. რის შემდეგაც პჯრ-რეალურ დროში მეშვეობით განვსაზღვრეთ რეკომბინანტული და მცენარეული დნმ-მარკერების რაოდენობა სუსპენზიაში.

მექანიკურ სანჯღრეველაზე წარდგენილი იყო 6 კომბინაცია:

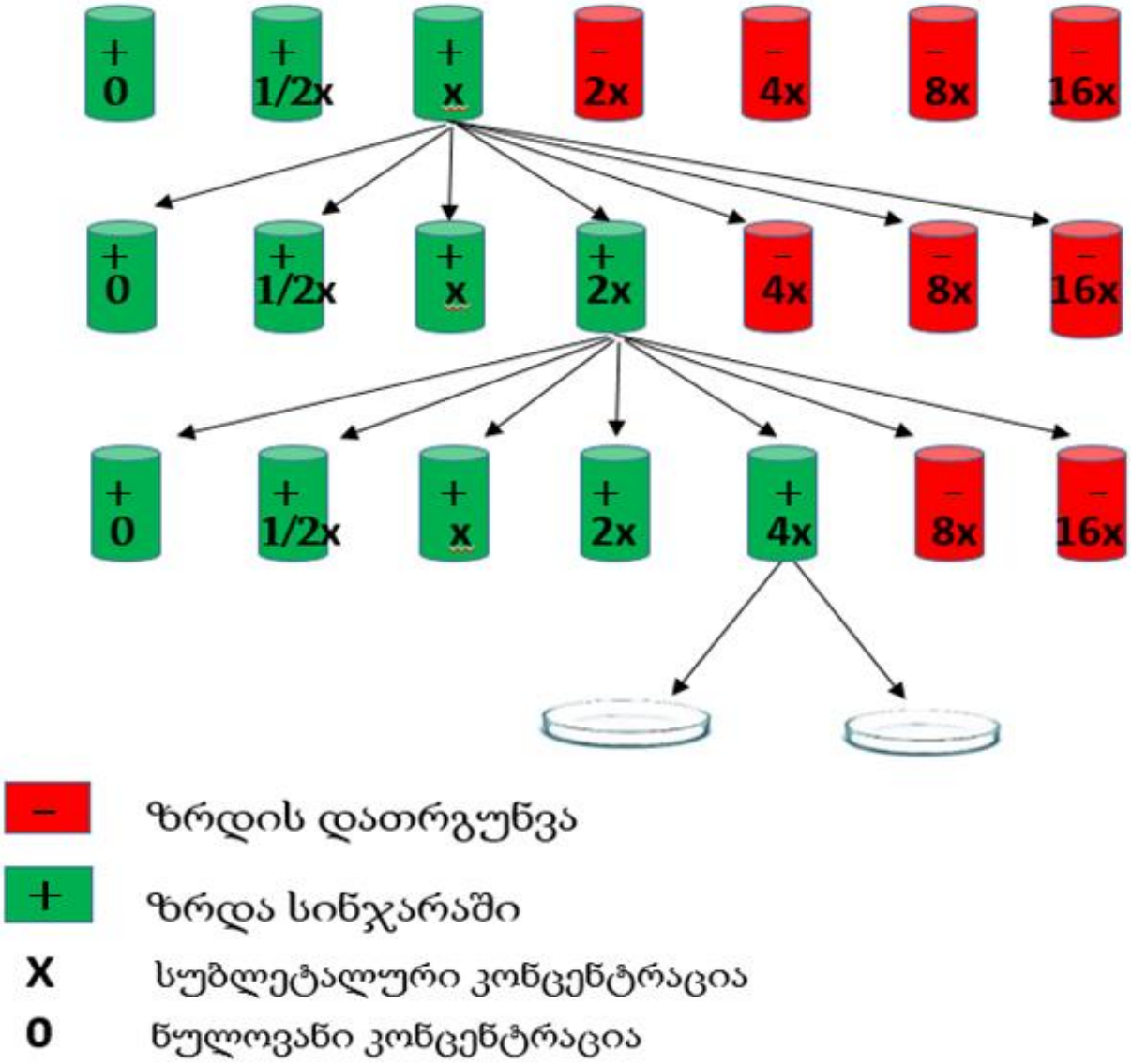
1. გმ სოიოს შემცველი სტერილური საკვები არე (კონტროლი)
2. არა გმ სოიოს შემცველი სტერილური საკვები არე (კონტროლი)
3. გმ სოიოს შემცველ საკვებ არეში კულტივირებული ***E.coli***
4. გმ სოიოს შემცველ საკვებ არეში კულტივირებული ***B.subtilis***
5. არა გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli***
6. არა გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis***

ინკუბაციის პირობები

ინკუბაცია მიმდინარეობდა 96სთ-ის განმავლობაში თხევად საკვებ არეში 37 ° C-ზე.

მექანიკურ სანჯღეველაზე (100-120 რხევა წთ-ში)

სქემა N1


+ 0
+ 1/2x
+ x
– 2x
– 4x
– 8x
– 16x
+ 0
+ 1/2x
+ x
+ 2x
– 4x
– 8x
– 16x
+ 0
+ 1/2x
+ x
+ 2x
+ 4x
– 8x
– 16x
– ზრდის დათრგუნვა
+ ზრდა სინჯარაში
X სუბლეტალური კონცენტრაცია
0 წულოვანი კონცენტრაცია

2.5 დნმ-ის ექსტრაქცია

არსებული ნიმუშებიდან დნმ-ს ექსტრაქცია განხორციელდა A-კიტის მეშვეობით. ექსტრაქცია განხორციელდა კიტის ინსტრუქციისამებრ.

გაგმოყენებული ხსნარები: რეაქტივი N2(ლიზის ბუფერი)

რეაქტივი N3 (პროტეინაზა K)

რეაქტივი N4

რეაქტივი N5

რეაქტივი N6

რეაქტივი N7

რეაქტივი N8

დამხმარე ხელსაწყოები/ ჭურჭელი: წყლის აბაზანა

მიკრო ცენტრიფუგა

ვარიაბელური ავტომატური პიპეტები (100-1000; 10-100 µl)

1,5 და 2,0 მლ სინჯარა

ვორტექსი

ყინულის აბაზანა

ცდის მსვლელობა:

- ვიღებთ 200მკლ ნიმუშს სუსპენზიის შემთხვევაში ხოლო ბაქტერიული კულტურის შემთხვევაში ვითებთ საბქტერიოლოგიური მარყუჯით კოლონიის მცირე ნაწილს
- ვამატებთ 800 მკლ ლიზის ბუფერს (N2)
- ვამატებთ 15 მკლ პროტეინაზა K (N3)
- ვანჯღრევთ და ვაყოვნებთ 30 წთ 60°C-ზე
- ვაგრილებთ სინჯარებს ოთახის ტემპერატურაზე 1-2 წთ-ის განმავლობაში
- ვაცენტრიფუგირებთ 5წთ-ის განმავლობაში 12-14000 ბრ/წთ

- გავამზადოთ 1,5 მლ სინჯარები და გადავიტანოთ 200მკლ რეაქტივი N4 და 40მკლ რეაქტივი N5
- 300მკლ სუპერნატანტი გადაგვაქვს სინჯარაში სადაც შეტანილია დამლექი რეაქტივი
- შევანჯღრიოთ და დავაყოვნოთ ოთახის ტემპერატურაზე 10 წთ.
- დავაცენტრიფუგიროთ 1 წთ 7000ბრ/წთ
- გადავღვაროთ სუპერნატანტი და პრეციპიტატს დავამატოთ 300მკლ რეაქტივი N6
- დავაცენტრიფუგიროთ 30 წმ 7000ბრ/წთ
- გადავღვაროთ სუპერნატანტი და პრეციპიტატს დავასხათ 500მკლ რეაქტივი N7
- შევანჯღტიოთ და დავაცენტრიფუგიროთ 30 წმ 7000ბრ/წთ
- გავიმეოროთ წინამდებარე ნაბიჯი თავიდან
- გადავღვაროთ სუპერნატანტი თაავახდილი სინჯარები მოვათავსოთ 10-15 წთ განმავლობაში 60°C-ზე
- მშრალ ნალექს სინჯარაში უნდა დავამატოთ რეაქტივი N8 შევანჯღრიოთ და დავაყოვნოთ 5წთ 60°C-ზე
- დავაცენტრიფუგიროთ 2წთ 12-14000 ბრ/წთ
- ამოვიღოთ 100-150 მკლ სუპერნატანტი

2.6 ნიმუშებიდან ექსტრაგირებული დნმ-ის რაოდენობა ნგ/მკლ

ნიმუში N	ნგ/მკლ	260/280	A260	260/230	A230	A280
1	1,46	0,42	0,03	0,28	0,11	0,07
2	6,65	2,66	0,13	1,43	0,09	0,05
3	0,39	0,75	0,01	0,15	0,05	0,01
4	1,21	0,36	0,02	0,25	0,1	0,07
5	1,37	0,94	0,03	1,26	0,02	0,03
6	4,5	3,05	0,09	1,85	0,05	0,03
7	4,55	2,55	0,09	1,59	0,06	0,04
8	4,97	5,51	0,1	13,51	0,01	0,02
9	4,55	3,34	0,09	9,22	0,01	0,03
10	8,8	0,59	0,18	3,42	0,05	0,03
11	6,65	2,66	0,13	1,98	0,07	0,05
12	4,78	7,59	0,1	3,19	0,03	0,01
13	0,76	0,38	0,02	0,33	0,05	0,04
14	4,64	7,81	0,09	7	0,01	0,01
15	4,55	4,41	0,09	2,29	0,04	0,02
16	8,25	3,3	0,17	2,35	0,07	0,05
17	8,25	3,3	0,17	2,21	0,07	0,05
18	0,48	0,22	0,01	0,78	0,01	0,04
19	8,25	24,67	0,17	5,5	0,03	0,01
20	4,5	4,5	0,09	3,49	0,03	0,02
21	2,42	1,43	0,05	1,26	0,04	0,03
22	5,21	13,33	0,1	6,33	0,02	0,01
23	11	3,67	0,22	3,03	0,07	0,06
24	4,97	17,46	0,1	4,92	0,02	0,01
25	12,65	4,22	0,25	3,81	0,07	0,06
26	2,04	1,4	0,04	1,24	0,03	0,03
27	2,2	1,45	0,04	1,53	0,03	0,03
28	5,5	1,83	0,11	4	0,03	0,06
29	6,65	13,34	0,13	3,22	0,04	0,01
30	9,35	1,3	0,19	2,17	0,09	0,14
31	13,74	3,93	0,27	3,44	0,08	0,07
32	1,09	0,37	0,02	0,37	0,06	0,06

1. ***B.subtilis*** სამუზეუმო შტამი
2. ***E.coli*** სამუზეუმო შტამი
3. ***B.subtilis*** გმ საკვებ არეზე კულტივირებული შტამი გლიპოსატის ეფექტის ქვეშ
4. ***B.subtilis*** გმ საკვებ არეზე კულტივირებული შტამი კანამიცინის ეფექტის ქვეშ

5. E.coli გმ საკვებ არეზე კულტივირებული შტამი გლიფოსატის ეფექტის ქვეშ
6. გმ სოიოს შემცველი საწყისი საკვები არე (სტერილური)
7. გრა გმ სოიოს შემცველი საწყისი საკვები არე (სტერილური)
8. გმ სოიოს შემცველი საკვები არე 24სთ-ის შემდეგ(სტერილური)
9. არა გმ სოიოს შემცველი საკვები არე 24სთ-ის შემდეგ(სტერილური)
10. გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli*** 24სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
11. არა გმ სოიო შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli*** 24სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
12. გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis*** 24სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
13. არა გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis*** 24სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
14. გმ სოიოს შემცველი საკვები არე 48სთ-ის შემდეგ(სტერილური)
15. არა გმ სოიოს შემცველი საკვები არე 48სთ-ის შემდეგ(სტერილური)
16. გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli*** 48სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
17. არა გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli*** 48სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
18. გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis*** 48სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
19. გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis*** 48სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
20. გმ სოიოს შემცველი საკვები არე 72 სთ-ის შემდეგ(სტერილური)
21. არა გმ სოიოს შემცველი საკვები არე 72 სთ-ის შემდეგ(სტერილური)
22. გმ სოიო შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli*** 72 სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
23. არა გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli*** 72 სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
24. გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis*** 72 სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
25. არა გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis*** 72 სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
26. გმ სოიოს შემცველი საკვები არე 96 სთ-ის შემდეგ(სტერილური)
27. არა გმ სოიოს შემცველი საკვები არე 96 სთ-ის შემდეგ(სტერილური)
28. გმ სოიო შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli*** 96 სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
29. არა გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***E.coli*** 96 სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
30. გმ სოიო შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis*** 96 სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)
31. არა გმ სოიოს შემცველ არეში კულტივირებული ***B.subtilis*** 96 სთ-ის შემდეგ (სუსპენზია)

32. ექსტრაქციის კონტროლი

პჯრ-რეალურ დროში განხორციელდა კომპანია „Termo Fisher”-ის მიერ წარმოებული QuantStudio 5 Real-Time PCR System-ით და სტანდარტული კიტით რომელიც შეიცავდა რაუნდაპ ტოლერანტული რეკომბინანტული სოიოს სკრინინგ უბნებისა და მცენარეული დნმ-ის სპეციფიკურ პრომოტორებს

3.1 შედეგები და განხილვა

3.2 გლიფოსატისა და კანამიცინის ფონზე კულტივირებული შტამების ზრდაზე დაკვირვების შედეგები

ექსპერიმენტის მსვლელობისას ჩვენს მიერ ჰერბიციდი გლიფოსატი და ანტიბიოტიკი კანამიცინი გამოყენებული იქნა როგორც მასტიმულირებელი ფაქტორი ბუნებრივი ტრანსფორმაციისა. ვაკვირდებოდით როგორც ექსპერიმენტულ ისე საკონტროლო ჯგუფებს, ექსპერიმენტულ ჯგუფის საკვებ არეში არსებული გენეტიკური კონსტრუქციით ტრანსფორმაციისა და მისი გამოყენების შემთხვევაში ექსპერიმენულ ჯგუფს უნდა დაეძლია გლიფოსატისა და კანამიცინის გაცილებით მაღალი კონცენტრაციები ვიდრე საკონტროლო ჯგუფს. საბოლოოდ ჩვენს მიერ ვერ იქნა ნანახი მნიშვნელოვანი განსხვავება ექსპერიმენტულ და საკონტროლო ჯგუფებს შორის კანამიცინისა და გლიფოსატის კონცენტრაციების დაძლევის მხრივ. სუბლეტალური კონცენტრაციები ექსპერიმენტის დაწყებისას და ექსპერიმენტის ბოლოს გამოიყურება შემდეგნაირად ცხრილისN1. კულტივაცია მიმდინარეობდა სქემა N1-ის მიხედვით. ექსპერიმენტის მსვლელობისას გაჩნდა ***E.coli***-ის რეზისტენტული ფორმები კანამიცინისა და გლიფოსატის მიმართ, როგორც ექსპერიმენტულ ისე საკონტროლო ჯგუფებში აქედან გამომდინარე შეგვიძლია ვივარაუდოთ რომ რეზისტენტული ფორმები გაჩნდა ბუნებრივი „შეგუების“ მეშვეობით და ადგილი არ ქონია რეკომბინანტული დნმ-ით ტრასნფორმაცია

ცხრილი N1

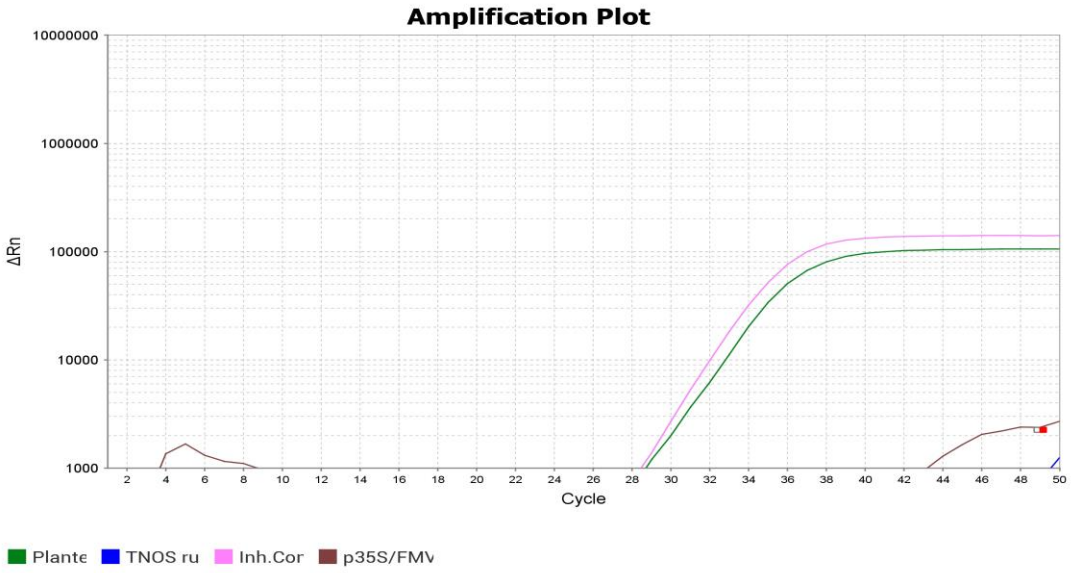
შტამი/ფაქტორი	**საწყისი სუბლეტალური კონცენტრაცია**	**ექსპერიმენტის დასრულებისას**
E.coli/ გლიფოსატი	**6μg/ml**	**50μg/ml**
E.coli/ კანამიცინი	**175 μg/ml**	**2500 μg/ml**
B.subtilis/ გლიფოსატი	**2μg/ml**	**2μg/ml**

B.subtilis/ კანამიცინი	8µg/ml	15µg/ml

3.3 გლიფოსატისა და კანამიცინის ფონზე კულტივირებული შტამების გენომის სკრინინგი გმო მარკერებზე

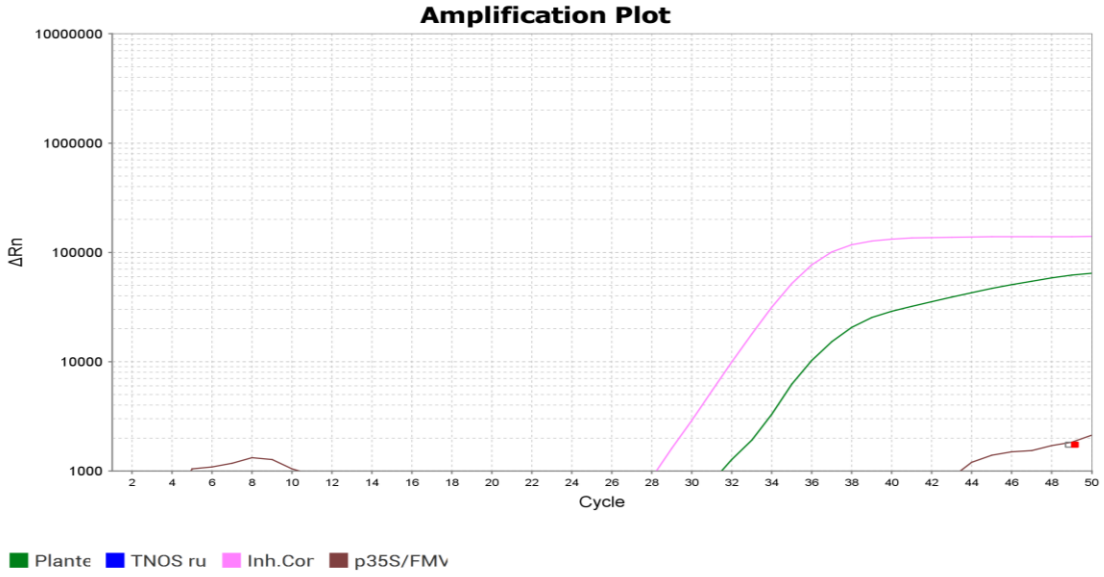
მიუხედავად შედეგებისა მოხდა არსებული შტამებიდან დნმ-ის ექსტრაქცია და პჯრ-რეალურ დროში-ს მეშვეობით გენეტიკური მარკერების ძიება.

- ***B.subtilis*** კულტივირებული გმ სოიოს შემცველ საკვებ არეზე გლიფოსატის ფონზე



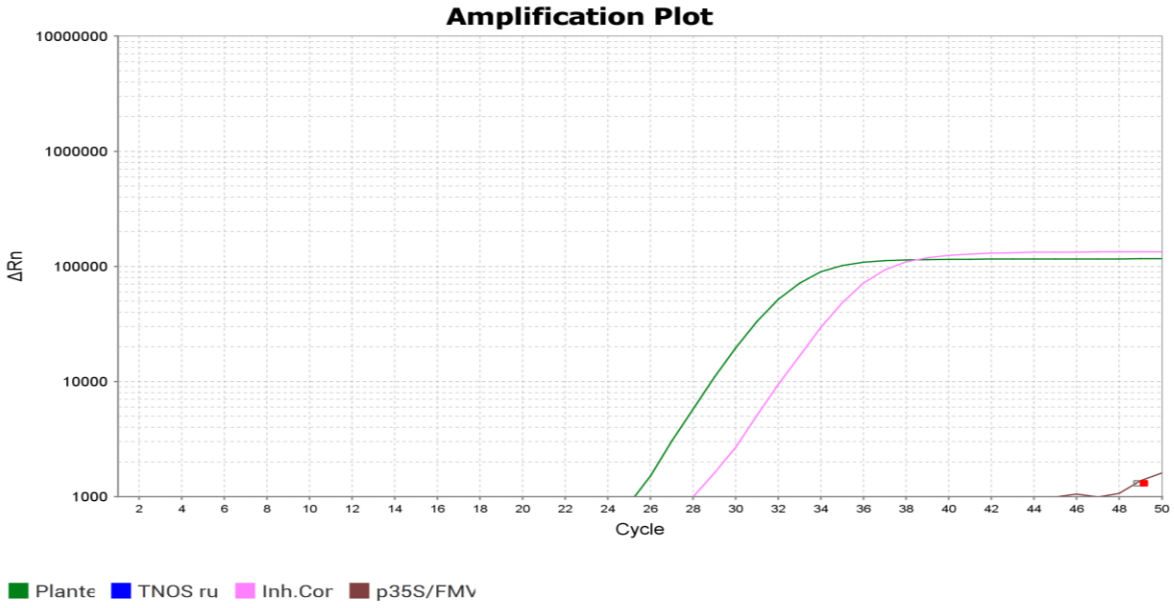
ბაქტერიული შტამიდან ექსტრაგირებულ დნმ-ში არ აღმოჩნდა გენეტიკურად მოდიფიცირებული სოიოს სკრინიგ უბნები TNOS და p35s.

- ***B.subtilis*** კულტივირებული გმ სოიოს შემცველ საკვებ არეზე კანამიცინის ფონზე



ბაქტერიული შტამიდან ექსტრაგირებულ დნმ-ში არ აღმოჩნდა გენეტიკურად მოდიფიცირებული სოიოს სკრინიგ უბნები TNOS და p35s.

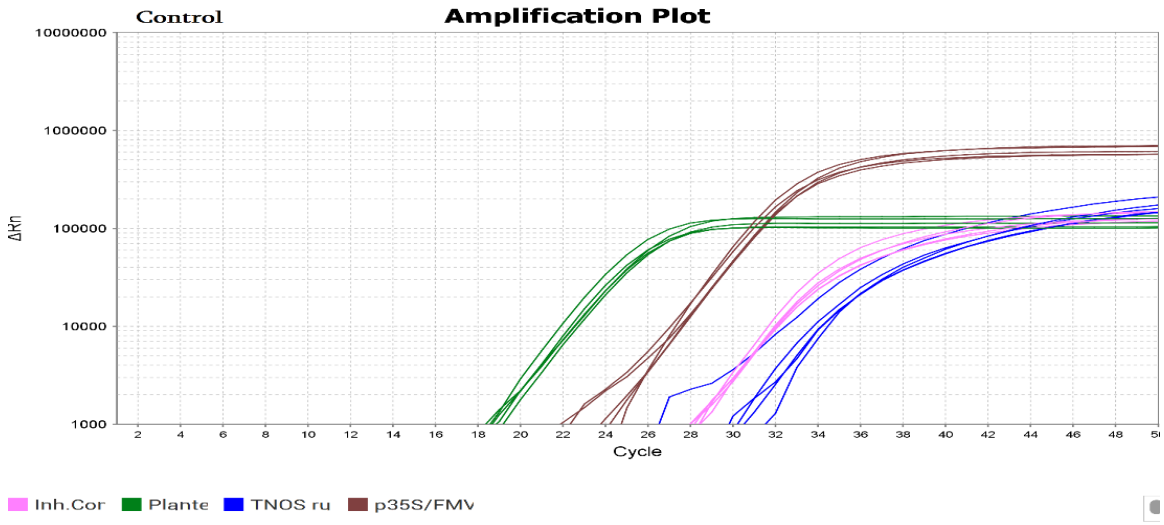
E.coli კულტივირებული გმ სოიოს შემცველ საკვებ არეზე გლიფოსატის ფონზე



ბაქტერიული შტამიდან ექსტრაგირებულ დნმ-ში არ აღმოჩნდა გენეტიკურად მოდიფიცირებული სოიოს სკრინიგ უბნები TNOS და p35s

3.4.1 მიკროორგანიზმების მიერ სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ის დეგრადაციის შედეგები in vitro პირობებში.

ჩვენს მიერ აღებული იქნა 0, 24, 48, 72 და 96 სთ-იანი ნიმუშები გმო სოიოს შემცველი სტერილური საკვები არიდან(კონტროლი) და შესწავლილი პჯრ-ის მეშვეობით

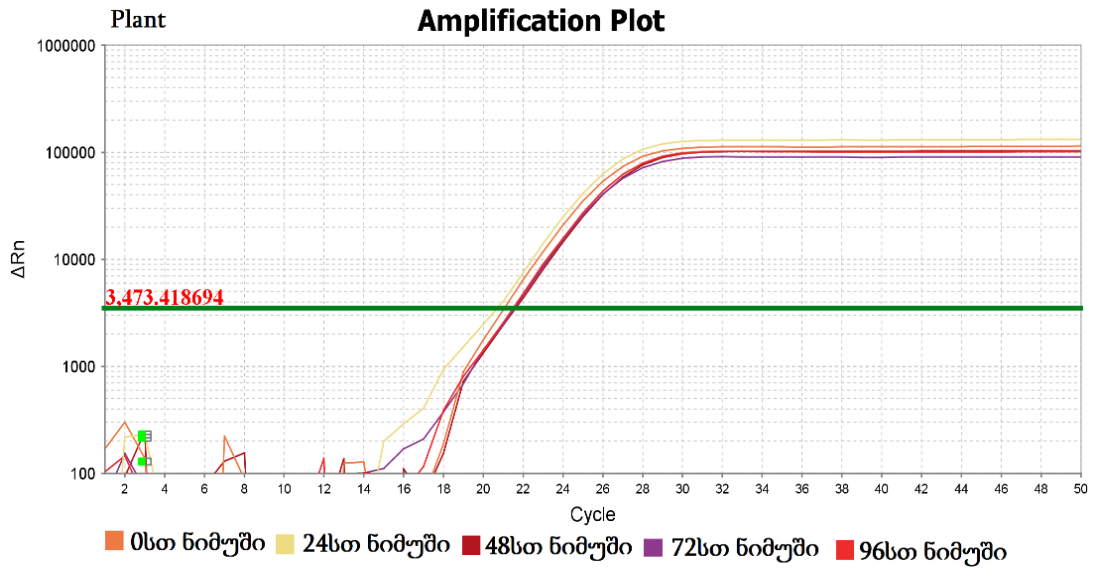


გრაფიკზე ჩანს რომ არც მცენარეული დნმ და არც გმ სკრინინგ უბნები არ განიცდის თვითდეგრადაციას 96სთ-ის განმავლობაში.

3.4.2 სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ს დეგრადაცია *E.Coli*-ის მიერ

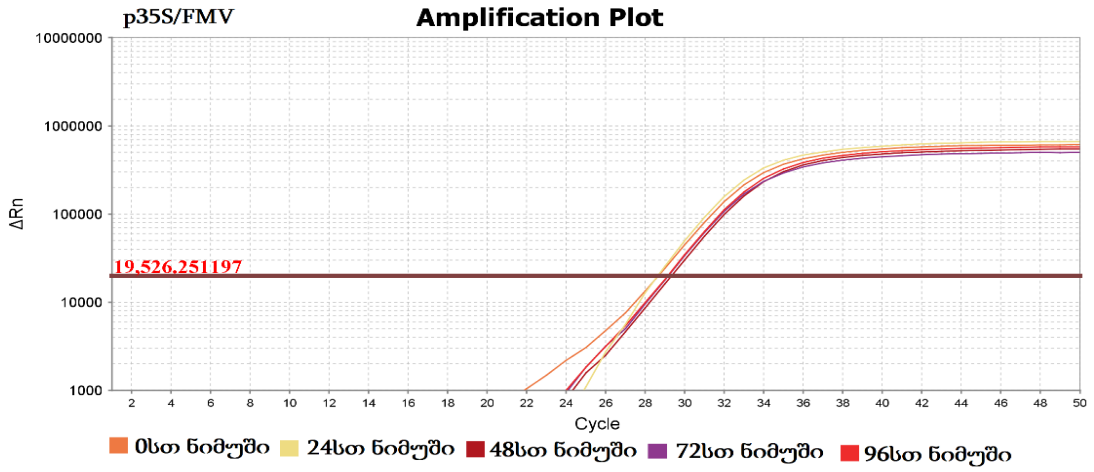
- აღებული იქნა 0, 24, 48, 72 და 96 სთ-იანი ნიმუშები გმო სოიოს შემცველი საკვები არიდან სადაც კულტივირებული იყო ***E.Coli***

მცენარეული დნმ



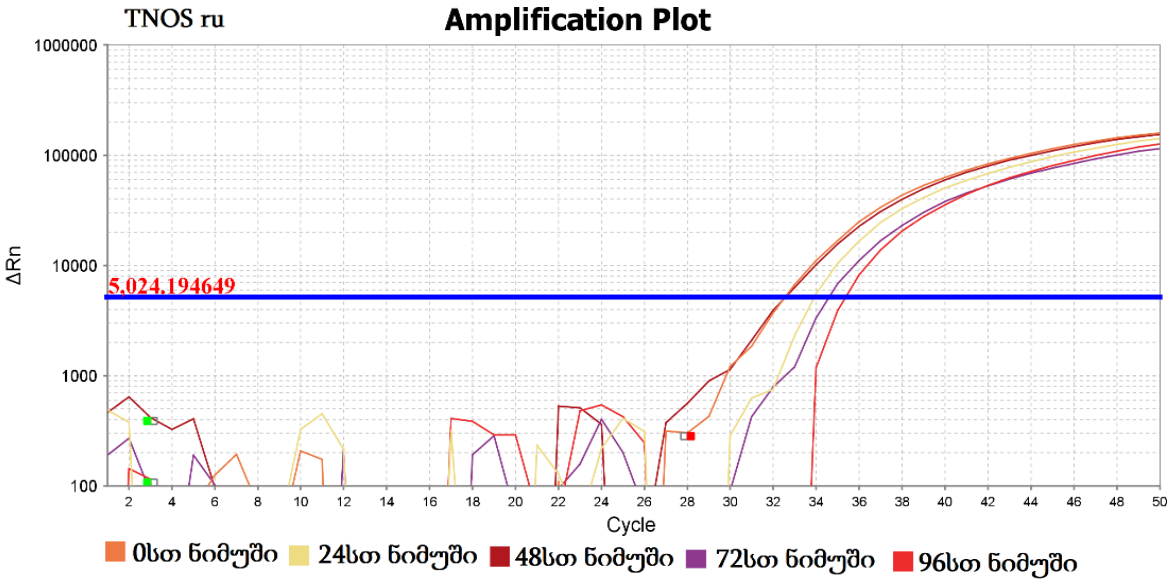
გრაფიკიდან ჩანს რომ 96სთ-ის განმავლობაში ***E.Coli***-იმ პრაქტიკულად ვერ მოახდინა მცენარეული დნმ-ის დეგრადაც

p35S სკრინინგ უბანი



გრაფიკიდან ჩანს რომ 96სთ-ის განმავლობაში ***E.Coli***-იმ პრაქტიკულად ვერ მოახდინა **p35S** სკრინინგ უბნის დეგრადაც

TNOS სკრინინგ უბანი



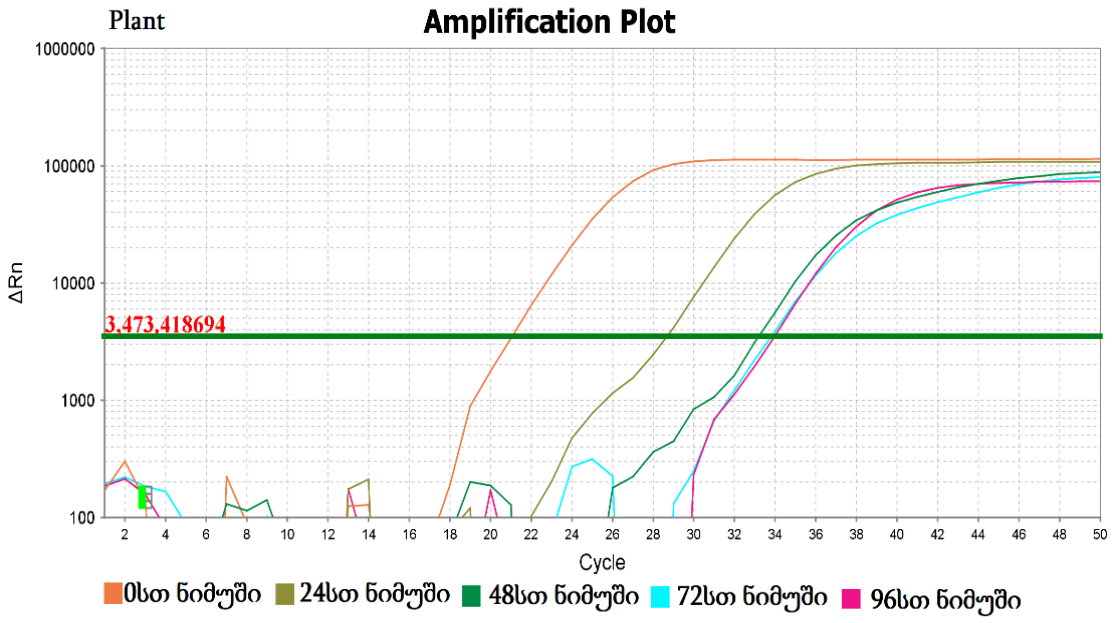
გრაფიკიდან ჩანს რომ 96სთ-ის განმავლობაში ***E.coli***-მა ვერ მოახდინა **TNOS** სკრინინგ უბნის დეგრადაცია

სამივე გრაფიკიდან გამომდინარე ჩანს, რომ ***E.coli***-ის მიერ ადგილის არ ქონია არეში დნმ-ის დეგრადააციას 96სთ-ს განმავლობაში. ჩვენი საძიებო უბნების რაოდენობა არეში პრაქტიკულად არ იცვლებოდა. შეგვიძლია ვთქვათ რომ უმნიშვნელო დეგრადააცია განიცადა **TNOS** სკრინინგ უბანმა.

3.4.3 სოიოს რეკომბინანტული დნმ-ს დეგრადაცია *B.subtilis* -ის მიერ

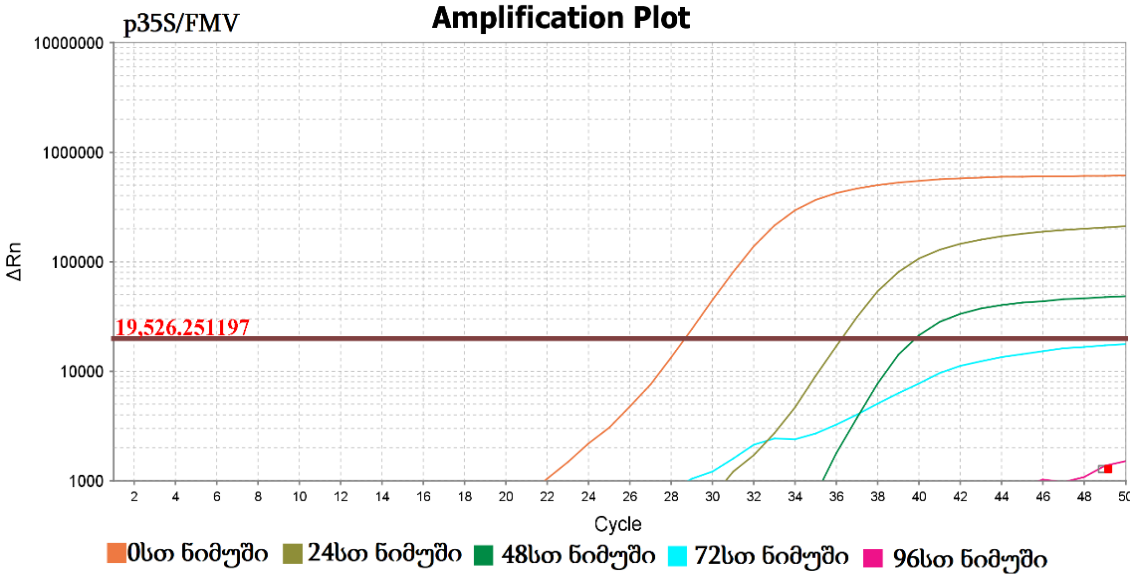
აღებულ იქნა 0, 24, 48, 72 და 96 სთ-იანი ნიმუშები გმო სოიოს შემცველი საკვები არიდან სადაც კულტივირებული იყო ***B.subtilis***

მცენარეული დნმ



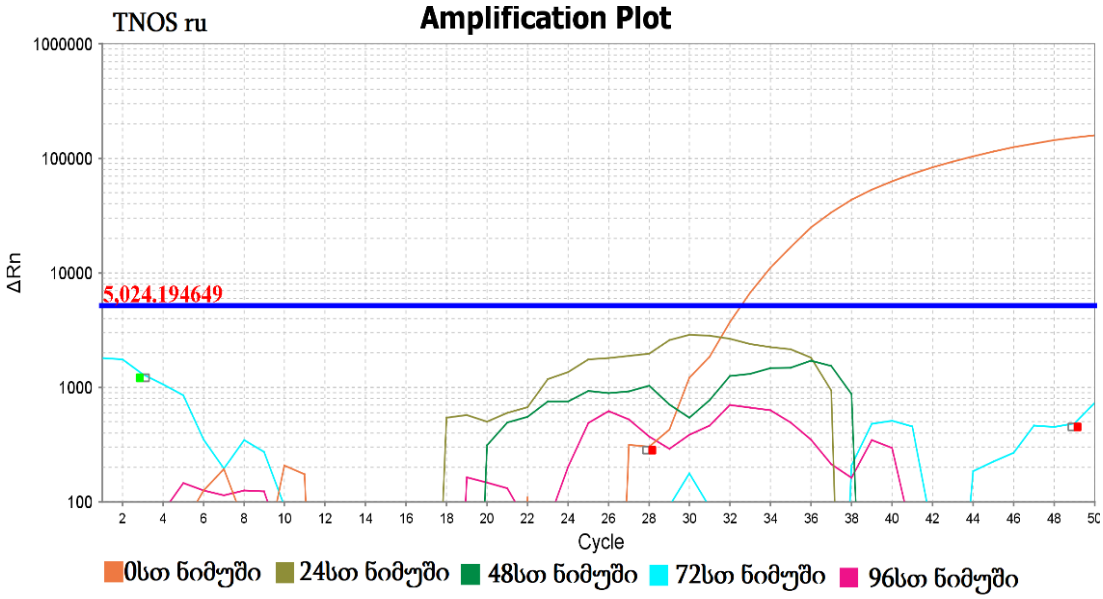
გრაფიკიდან ჩანს რომ ***B.subtilis*** -მა მოახდინა მცენარეული დნმ-ის ნაწილობრივი დეგრადაცია

p35S სკრინინგ უბანი



გრაფიკიდან ჩანს რომ ***B.subtilis*** -მა არეში არსებული გმო სკრინინგ უბნის **p35S**-ის დეგრადაცია მოახდინა დაახლოებით 48სთ-ის განმავლობაში.

TNOS სკრინინგ უბანი



გრაფიკიდან ჩანს რომ ***B.subtilis***-მა მოახდინა გმო სკრინინგ უბნის **TNOS**-ის სრული დეგრადაცია 24სთ-ზე ნაკლებ დროში.

3.5 შედეგების შეჯამება

- ჩვენს მიერ შერჩეული მეთოდოლოგიით გენთა ჰორიზონტალური ტრასნფერი არ დადასტურდა „რაუნდაპ ტოლერანტულ“ გმ სოიოსა და ჩვენს მიერ შერჩეულ ექსპერიმენტულ მიკროორგანიზმებს შორის

- ექსპერიმენტის მსვლელობისას ბუნებრივად გაჩნდა ექსპერიმენტული მიკროორგანიზმების რეზისტენტული ფორმები. ***E.coli*** და ***B.subtilis***-მა გამოავლინა სტრესულ პირობებთან ადაპტაციის განსხვავებული უნარი. ***E.coli***-კარგად შეეგუა კანამიცინისა და გლიფოსატის მაღალ კონცენტრაციებს განსხვავებით ***B.subtilis***-სგან რომელმაც პრაქტიკულად ვერ გამოავლინა ექსპერიმენტის მსვლელობისას კანამიცინისა და გლიფოსატის მიმართ შემგუებლობა. რადგან რეზისტეტნული ფორმების გაჩენა მოხდა როგორც ექსპერიმენტულ ისე საკონტოლო ჯგუფში შეგვიძლია ვივარაუდოთ რომ რეზისტენტობის გაჩენაში არ მონაწილეობდა ექსპერიმენტული

ჯგუფის საკვებ არეში წარმოდგენილი რეკომბინანტული დნმ. ექსპერიმენტის ხანგრძლივობიდან გამომდინარე ნაკლებად სავარაუდოა მუტანტური ფორმების გაჩენა. შეგვიძლია ვივარაუდოთ რომ რეზისტენტობის გაჩენა უკავშირდება გარკვეული გენების ექსპრესიის გაძლიერებას. ექსპერიმენტულ მიკროორგანიზმებს შორის ასეთი განსხვავება შესაძლოა აიხსნას მიკროორგანიზმების სახეობრივი თავისებურებებით. სავარაუდოა რომ ***B.subtilis***-სგან განსხვავებით ***E.coli***-ს ქონდა გარკვეული გენეტიკური წინაპირობები რის მეშვეობითაც ადვილად მოახდინა ადაპტაცია კანამიცინისა და გლიფოსატის მაღალ კონცენტრაციებზე.

- ***E.coli***-მა და ***B.subtilis***-მა გამოავლინა დნმ-ის დეგრადაციის განსხვავებული უნარი.

  E.coli-მა 96სთ-ის განმავლობაში ვერ მოახერხა მცენარეული და რეკომბინანტული დნმ-ის სკრინინგ უბნების დეგრადაცია, მათი რაოდენობა უმნიშვნელოდ შემცირდა თხევად საკვებ არეში.

  B.subtilis-მა მოახდინა არეში არსებული მცენარეული და რეკომბინანტული დნმ-ის სკრინინგ უბნების დეგრადაცია. მცენარეული დნმ-ის რაოდენობა შემცირდა საგრძნობლად ხოლო რეკომბინანტული დნმ-ს სკრინინგ უბნების უტილიზაცია მოახდინა ბოლომდე p35S-ის დაახლოებით 48სთ-ში ხოლო TNOS-ის 24სთ-ზე ნაკლებ დროში.

  როგორც ცნობილია მიკროორგანიზმებს შეუძლია არეში არსებული დნმ-ის და რნმ-ის უტილიზაცია ექსტრაუჯრედული ნუკლიაზებით, და შემდგომ მათი გამოყენება როგორ პურინებისა და პირიმიდინების წყაროდ, ლიმიტირებული საკვები არის შემთხვევაში კი როგორც ნახშირბადის წყარო.

  ჩვენს მიერ შერჩეული შტამების მიერ ნაჩვენები ასეთი განსხვავებული შედეგები შესაძლოა აიხსნა სახეობების ფიზიოლოგიური თავისებურებებით, კერძოდ ***B.subtilis***-ს ***E.coli***-თან სედარებით უჯეთ აქვს გამოხატული ეგზოგენური ნუკლეაზების წარმოქმნის უნარი.

- გმო მარკერები p35S და TNOS-ს გამოავლინეს განსხვავებული მდგრადობა ბაქტერიული დეგრადაციის მიმართ. ***B.subtilis***-ის მიერ p35S გაცილებნით მდგრადი აღმოჩნდა TNOS-სთან შედარებით.

დასკვნა

რეკომბინანტული დნმ-ს დესტრუქციისა და ქიმიურ ტოქსიკანტებთან ადაპტაციის უნარი განსხვავებულია და დამოკიდებულია მიკროორგანიზმების სახეობრივ კუთვნილებაზე. ასევე განსხვავებულია გმო სკრინინგ უბნების მდგრადობა მიკროორგანიზმთა მიერ დეტერმინირებული დეგრადაციის პროცესებისადმი.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. „აგრობიოტექნოლოგია“ 2012წ. ა.კორახაშვილი მ.გაიდამაშვილი გვ. 33-36
2. „ზოგადი გენეტიკა“ 2015წ. ა.შათირიშვილი ნ.დვალიშვილი გვ.5-7
3. საქართველოს კანონი ცოცხალი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების შესახებ კარი I. ზოგადი ნაწილი თავი I. ზოგადი დებულებანი მუხლი 4. ბ); გ).
4. Brief Look at the Long History of GMO Technology. Gabriel Rangel Harvard University School of art and science
5. Determination of free DNA in soils. Authors J Niemeyer, F. Gessler
6. E. coli; WHO 7 February 2018.
7. Escherichia coli Jan T. Poolman, in International Encyclopedia of Public Health (Second Edition), 2017
8. *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 8739™)
9. Expression of competence genes in Bacillus subtilis. M Albano, J Hahn, and D Dubnau
10. IN situ transfer of antibiotiv resistance genes from transgenic tobacco plants to bacteria. Authors Elisabeth Kay, Timothy M. vogel
11. Medical Microbiology. 4th edition. Chapter 5Genetics. Randall K. Holmes and Michael G. Jobling.
12. Microbiological reviews. Natural and ather bacterial transformation. Michael G.LorenzWilfrid Wackelnagel pg-565.
13. Microbiological reviews. Protection of extracellular DNA. Michael G.LorenzWilfrid Wackelnagel pg-573.
14. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. Authors Kaare M. Nielsen Pal J. Jonshen.
15. Risk from GMOs due to horizontal Gene transfer. Author Paul Keese 07.2008
16. Statista.com
17. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms. M. Querci, M. Mazzara
18. The fate of recombinant plant DNA in soil. Authors Widmer et

19. The Study on the factors affecting transformation efficiency of E. coli competent cells. Xiaofeng Liu1 , Lin Liu1 , Yonggang Wang1
20. Transformation of Acinetobacter sp. Strain BD431 with transgenic Plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selectiom of transformants. Authors KMAARE M. NIELSEN; JAN D.
21. Unintended Horizontal Transfer of Recombinant DNA. Authors Kaare M.nielsen Daniele Daffonchio.
22. Visual evidence of horizontal gene transfer between plants and bacteria in the phytosphere of transplantomiv tobacco
23. 5—Enolpyruvylshikimate 3—Phosphate Synthase From Biochemistry to Genetic Engineering of Glyphosate Tolerance. G. Kishore, D. Shah, S. Padgette, G. della-Cioppa