

2. pielikums. Riska novērtējuma kopsavilkums

LUBF paziņo, ka ierobežotai izmantošanai paredzētajam ĢMM nepiemīt MK noteikumu 29. punktā noteiktās kaitīgās īpašības.

| | |
|---|---|
| 30. 1. Re cipi ent a mi kro org ani sm s | <p>Ļoti īsi apraksta visus apakšpunktus par recipienta mikroorganismu</p> <p><i>Escherichia coli</i> ir baktērija, kas pieder proteobaktēriju tipam. Lai gan daži <i>E. coli</i> celmi ir patogēni, laboratorijā lietotie celmi ir atvasināti no <i>E. coli</i> K12, kas nav patogēns. <i>E. coli</i> K12 ir visplašāk pielietotais organisms ģenētisko manipulāciju veikšanai. Oriģinālais K12 celms tika izolēts 1922. g. un bija prototrofs, taču ģēnu inženierijā izmantotie atvasinātie celmi ir auksotrofi un nespēj kolonizēt cilvēka zarnas (Smith, 1975). Detalizēta informācija par K-12 atvasinājumiem pieejama zinātniskajā literatūrā, piemēram, Bachmann, 1996.</p> <p>30.1.1. patogenitāti, virulenci, spēju inficēt, alergēniskumu, toksicitāti un tajā esošos slimības pārnese vektorus;</p> <p>Lai gan <i>E. coli</i> savvaļas celmi var būt patogēni cilvēkam un tāpēc nav iekļauti GRAS vai QPS sarakstos, <i>E. coli</i> K-12 celma atvasinājumi laika gaitā ir tikuši vairākkārt mutāģenizēti, kā arī laboratorijas apstākļos uzkrājuši virkni spontāno mutāciju. K-12 celma atvasinājumi ir auksotrofi un nespēj kolonizēt cilvēka zarnu traktu (Bahmann 1996; Smith 1975). Ņemot vērā paredzēto ierobežotās izmantošanas veidu laboratorijā, izmantojot individuālos aizsardzības līdzekļus, sagaidāms, ka <i>E. coli</i> K12 celma atvasinājumi nav patogēni, tiem nepiemīt virulence, tās nespēj inficēt cilvēku un dzīvniekus. Nav informācijas par <i>E. coli</i> K12 toksiskumu, vai izraisītām alergijām.</p> <p>30.1.2. <i>Lolium perenne</i> (daudzgadīgā airene) ir graudzāļu dzimtas lauksaimniecības augs, ko plaši pielieto zālāju un ganību veidošanā. Tās dabiskais areāls ir Tuvie Austrumi, bet domesticētās formas ir izplatītas visā pasaulē. Pētījumā paredzēts izmantot daudzgadīgās airenies protoplastu kultūras, kas iegūtas no sterilā <i>in vitro</i> kultūrā audzētiem dzinumiem. Protoplasti ir lapu mezofila šūnas, kas apstrādātas ar enzīmiem, lai atbrīvotos no šūnu sienas un atvieglotu protoplastu ģenētisko transformāciju. Protoplastu kultivēšana notiek specializētās barotnēs sterilos apstākļos nelielā tilpumā (mazāk par 10 ml). Protoplasti nevar spontāni reģenerēties par veselīgiem augiem un tie ir pilnībā atkarīgi no kultivēšanas specializētās barotnēs. Pēc eksperimenta beigām genomiski rediģētās protoplastu kultūras tiek likvidētas.</p> <p>30.1.2. vektora un nejausā ierosinātāja dabu;</p> <p>LUBF tiek izmantota komerciāli pieejamā <i>E. coli</i> CRISPR-Cas9 plazmīda pJD633, kas pieejama no AddGene (https://www.addgene.org/160393/). Plazmīdas konstrukcija ir aprakstīta zinātniskā publikācijā (Debernardi et al., 2020).</p> <p>30.1.3. vietas, kur vektori un nejausie ierosinātāji var mobilizēt insertēto ģenētisko materiālu un mobilizācijas biežumu;</p> |
|---|---|

Plazmīdai pJD633 ir ekstrahromosomāls raksturs un tā netiek integrēta saimniekorganisma *Escherichia coli* genomā. pJD633 tiek ievadīta protoplastu kultūrā esošajās augu šūnās vai nu ar elektroporācijas vai PEG palīdzību. Šajā laikā notiek plazmīdas gēnu tranzienta ekspresija izmantojot augiem specifiskus promoterus, taču T-DNS rajona integrācija augu protoplastu genomā nevar notikt, jo pietrūkst virulences faktori. Protoplasti ekspresē Cas9 proteīnu, kā arī specifiskas sgRNS, kas veic protoplastu genoma rediģēšanu. Eksperimenta mērķis ir noteikt sgRNS virzītās genoma rediģēšanas efektivitāti atkarībā no sgRNS sekvenču.

30.1.4. aktivitāti samazinošu mutāciju veidu un to noturīgumu, ja tādas ir;

Nav konstatētas

30.1.5. iepriekš veiktās ģenētiskās modifikācijas;

Nav veiktas

30.1.6. donoru mikroorganismu loku;

Escherichia coli, *Agrobacterium tumefaciens*

30.1.7. nozīmīgākās fizioloģiskās īpašības, kas varētu tikt mainītas galīgajā ģenētiski modificētajā mikroorganismā, un attiecīgā gadījumā – to noturīgumu;

Fizioloģiskās īpašības netiek izmainītas

30.1.8. dabisko biotopu un ģeogrāfisko izplatību;

E. coli celmi sastopami visā pasaulē, pārsvarā kanalizācijas notekūdeņos. Laboratorijas celma K-12 atvasinājumi ir auktrotrofi un dabiskajos apstākļos nespēj augt un vairoties. Daudzgadīgā aere ir plaši sastopama Eiropā gan savvaļā, gan cilvēka veidotās zālajos un ganībās. Daudzgadīgās aeres protoplastu kultūras nav spējīgas izdzīvot, vairoties un reģenerēties par augiem apkārtējā vidē.

30.1.9. līdzdalību, kas nozīmīga vides procesos;

E. coli laboratorijas celmi ir auktrotrofi un nespēj dzīvot un vairoties savā dabiskajā vidē. Daudzgadīgās aeres protoplastu kultūras nespēj vairoties un spontāni reģenerēt jaunus augus no genomiski rediģētām šūnām. Tās var pastāvēt tikai sterilā vidē precīzi kontrolētos apstākļos. Paredzams, ka ģenētiskās modifikācijas, kas tiks veiktas ar *E. coli* un daudzgadīgās aeres protoplastu kultūrām neizmainīs šo organismu īpašības tādā veidā, ka tie varētu ietekmēt apkārtējo vidi.

30.1.10. mijiedarbību ar citiem mikroorganismiem vidē un tās sekas;

Sk. 30.1.9.

| | |
|--------------------------------------|---|
| | <p>30.1.11. spēju veidot struktūras, kas nepieciešamas dzīvības saglabāšanai;</p> <p>Nav attiecināms</p> |
| <p>30.2. Do norāda mikroorganism</p> | <p>Ļoti īsi apraksta visus apakšpunktus par donora mikroorganismu</p> <p>30.2.1. patogenitāti, virulenci, spēju inficēt, alergēniskumu, toksicitāti un tajā esošos slimības pārnese vektorus;</p> <p>Eksperimentā plānots izmantot <i>E. coli</i> konstruētu T-DNS plazmīdu pJD633, kurā starp diviem AarI saitēm būs klonētas 20 bp protospesera sekvences, kas pēc tam auga šūnās tiks transkribētas par sgRNS, kas virzīs Cas9 nukleāzi uz noteiktu daudzgadīgās aiereses genoma rajonu. 20 bp protospesera sekvences ir 100% komplementāras auga gēnam, kuru paredzēts rediģēt, attiecīgi var uzskatīt, ka šīs sekvences ir cēlušās no auga genoma. Plazmīdas pJD633 T-DNS rajons, kas tiks tranzienti ekspresēts daudzgadīgās aiereses protoplastu kultūrā papildus satur Cas9 gēnu, GRF4-GIF1 sapludināto gēnu, kā arī higromicīna rezistences gēnu. Cas9 gēns ir iegūts no baktērijas <i>Streptococcus pyogenes</i>, un optimizēts ekspresijai viendīgļlapju šūnās. GRF4-GIF1 gēns ir iegūts sapludinot divus kviešu gēnus GRF4 un GIF1 (Debernardi et al., 2020). Higromicīna rezistences gēns ir iegūts no <i>Escherichia coli</i> (Gritz and Davies, 1983). Mūsu rīcībā nav informācijas, ka minētajiem proteīniem piemistu patoģenitātes, toksiskuma vai alerģenitātes īpašības, turklāt visi gēni un to sintezētie proteīni jau ir sastopami apkārtējā vidē. Jāņem vērā, ka minētie proteīni tiks sintezēti protoplastu kultūrās ierobežotā tilpumā (<10 ml) ļoti nelielā daudzumā. Protoplastu kultūras pēc primārā eksperimenta veikšanas tiks likvidētas apstrādājot ar nātrija hipohlorītu saturošu balinātāju.</p> <p>30.2.2. izmantojamās vektorus, papildus norādot:</p> <p>Plazmīda pJD633 (https://www.addgene.org/160393/)</p> <p>30.2.2.1. sekвени;</p> <pre>tccatttgtatgtgcatgccaaccacaggggtccccctcgggatcaaagtactttgatccaac ccctccgctgctatagtgacgttcagtgacgcccgtcttctgaaaacgac atgtcgcacaagtcctaagttacgcgacagggctgccgccctgcccttttccctggcggtttct tgtcgcgtgttttagtcgcataaaagtagaataacttgcgactagaaccggagacattacgcca tgaacaagagcgcgcgctggcctgctgggctatgcccgcgctcagcaccgacgaccaggac ttgaccaaccaacggggcgaactgcacgcggcggcgtgcaccaagctgttttccgagaagat caccggcaccaggcgcgaccgcccggagctggccaggatgcttgaccacctacgcccctggcg acgttgtgacagtgaccaggctagaccgcccggagctggcccgcagcaccgcgacctactggacatt gccgagcgcattccaggaggcggcggcggcctgctagcctggcagagccgtgggcccgcac caccacgcggcggcggcgcgcatggtgttgaccgtgttcgcccgcattgcccagttcgagcgtt ccctaatacgcgaccgaccggagcgggcccgcgaggccgccaaggcccggcggtgaagttt ggccccgcctaccctcaccggcagacagatcgcgcacgcccgcgagctgatcgaccagga aggccgcaccgtgaaagaggcggctgcaactgcttggcgtgcatcgctcgaccctgtaccgcg cacttgagcgcagcgagggaagtgcgcccaccgaggccaggcggcgcggtgcttccgtgag gacgcattgaccgaggccgacgcccctggcggcggcggcggagaatgaacgccaagaggaacaagc atgaaaccgcaccaggacggccaggacgaaccgtttttcattaccgaagagatcgaggcggga gatgatcgcggcgggtacgtgttcgagccgcccgcgcacggctcaaccgtgcccgtgcatg aaatcctggcgggtttgtctgatgccaagctggcggcctggcccggccagcttggccgctgaa gaaaccgagcgcgcgctctaaaaaggtgatgtgtatttgagtaaaacagcttgcgctcatgc ggtcgctgcttatatgatgcgatgagtaaaataaacaataacgcaaggggaaacgcatgaaggt tatcgctgtacttaaccagaaaggcgggtcaggcaagacgacctcgcaaccatctagccc gcgccctgcaactcgcggggccgatgttctgtagtcgattccgatccccagggcagtgcc</pre> |

cgcgattggggcgccgctgcccgaagatcaaccgctaaccggtgtcgccatcgaccgcccgc
gattgaccgcgacgtgaaggccatcgccggcgcgacttcgtagtgatcgacggagcgccc
aggcgggcgacttggctgtgtccgcgatcaaggcagccgacttcgtgctgattccgggtgag
ccaagcccttacgacatatggggccaccgcccagcctggggagctgggtaagcagcgcattga
ggtcacggatggaaggctacaagcggcctttgtcggtgcgcccggcgatcaaaggcagcgca
tcggcggtgagggttgcgagggcgtggccgggtacgagctgcccattcttgagtcggctatc
acgcagcgcgtgagctaccaggcactgcccggcggcgcacaaaccggttcttgaatcagaacc
cgagggcgacgctgcccgcgaggtccaggcgctggccgctgaaattaaactcaaaactcattt
gagttaatgaggtaaagagaaaatgagcaaaagcacaacacgctaagtgcgggcccgtccga
gcccagcagcagcaaggctgcaacggttggccagcctggcagacacgcccagccatgaagcgg
gtcaactttcagttgcccgggaggatcacaccaagctgaagatgtacgcccagcccaagg
caagaccattaccgagctgctatctgaatacatcgccgagctaccagagtaaatgagcaaat
gaataaattagtagatgaatttttagcggctaaaggaggcggcatggaaaatcaagaacaacc
aggcaccgacgcccgtggaatgccccatggtgtggaggaaacggggcgggtggccaggcgaagc
gctgggttgcctgcccggcctgcaatggcactggaacccccaaagcccaggaatcggcgtga
gcccgtgcaaacccatccggcccgggtacaaatcggcggcggcgtgggtgatgacctggggag
aagttgaaggcgcgagggcggcccagcggcaacgcacatcgaggcagaagcagccccggtga
atcgtggcaagcggcggctgatcgaatccgcaagaatcccggcaaccgcccggcagccggtg
cgccgtcgattaggaagcccgaaggggcagcagcaaccagatTTTTTcgttccgatgctc
tatgacgtgggcccgcgatagtcgcagcatcatggacgtggccggttttccgtctgtcgaa
gctgaccgacgagctggcgaggtgatccgctacgagctccagacgggcacgtagaggttt
ccgagggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
catctaaccgaatccatgaaccgataaccgggaagggaaggagacaagcccggcggcggcgtgtt
ccgtccacacggttgcggacgtactcaagttctgcccggcggcggcggcggcggcggcggcggc
acgacctggtagaaacctgcattcgggttaaaccacacgcacggttgccatgcagcgtacgaag
aaggccaagaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gatcgtaaagagcgaaccggggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
accgagatcacagaaggcaagaaccgggacgtgctgacgggttcccccgattactTTTTTg
atcgatccccgcatcgccggttttctctaccgctggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
agccagatgggtgttcaagacgatctacgaacgcagtgggcagcggcggcggcggcggcggcggcggc
tctgtttaccggtgcccgaagctgatcgggtcaaatgacctgcccggagtagcatttgaaggag
gaggcggggcaggtgcccggatcctagtcagcgtaccgcaacctgatcgaggggcgaagc
atccgcccggttcctaattgtacggagcagatgctagggcaaatgcccctagcaggggaaaaag
gtcgaaaaggcctctttcctgtggatagcagctacattgggaacccaaagccgtacattggg
aaccggaaccggtacattgggaacccaaagccgtacattgggaacccggtcacacatgtaagt
gactgatataaaagagaaaaaaggcgatTTTTTccgctaaaactctttaaacttattaaaa
ctcttaaaccgcccgtggcctgtgcataactgtctggccagcgcacagcccagagctgcaa
aaagcgcctacccttcggctcgtgcgctccctacgccccggcgttcgctcggcctatcgc
ggccgctggccgctcaaaaatggctggcctacggccaggcaatctaccagggcggcggcgaag
ccgcccgtcggcactcgaccgcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
tgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggaaacgggtcacagcttgtctgtaag
cggatgcccgggagcagacaagcccgtcagggcggcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggc
gcagccatgaccagtcacgtagcagatagcggagtgataactggcttaactatgcccgatca
gagcagattgtactgagagtgaccataatgcccgtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggag
aaaataccgcacagccctcttccgcttctcgtcactgactcgtcggctcggctcgttc
ggctgcccggagcggatcagctcactcaaaggcggtaatacgggttatccacagaatcaggg
gataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggc
cgcgttgcggcgtttttccataggtccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgct
caagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagc
tccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgcccgttaccggataacctgtccgcctttctccc
ttcgggaagcgtggcgttttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcg
ttcgtccaagctgggctgtgtgacgaacccccggttcagcccagccgctgccccttatcc
ggtaactatcgtcttgagtcacaaccggtaagacacgacttatcggcactggcagcagccac
tggtaacaggattagcagagcggaggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaagtgggtggc
ctaactacggctacactagaaggacagtatTTTggatctgcccgtctgctgaagccagttacc
ttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtgggttt
TTTTTgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatct
tttctacgggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttgggtcatgcat
tctaggtactaaaaaattcatccagtaaaaataataatTTTTTctcccaatcaggctt
gatcccagtaagtcaaaaaatagctcgacatactgttcttccccgatatacctccctgatcg
accggacgcagaaggcaatgtcataccacttgtccgcccgttctcccaagatcaata

aagccacttactttgccatctttcacaagatggttgetgtctcccaggtcgccgtgggaaaa
gacaagttcctcttcgggcttttccgctctttaaataacatacagctcgccgagatctttaa
atggagtgctcttctccagtttccgcaatccacatcggccagatcgttattcagtaagtaa
tccaattcggctaagcggctgtctaagctattcgtatagggacaatccgatatgctgatgga
gtgaaagagcctgatgcactccgcatacagctcgataatcttttcagggctttgttcatctt
catactcttccgagcaaaggacgccatcggcctcactcatgagcagattgctccagccatca
tgccgttcaaagtgcaggacctttggaacaggcagcttcttccagccatagcatcatgtc
cttttccggttccacatcataggtgggtccctttataccggctgtccgtcatttttaataata
ggttttcattttctcccaccagcttatataccttagcaggagacattccttccgatatctttt
acgcagcgggtatttttcgatcagtttttcaattccgggtgatattctcatttttagccattta
ttatttcttctcttttctacagtttttaagataccccaagaagctaattataacaagac
gaactccaattcactgttcccttgcattctaaaaccttaataaccagaaaaacagctttttcaa
agttgttttcaaagttggcgtataacatagtatcgacggagccgattttgaaaccgcggtga
tcacaggcagcaacgctctgtcatcgttacaatcaacatgctaccctccgcgagatcatccg
tgtttcaaaccggcagcttagttgcccgttcttccgaatagcatcggtaacatgagcaaaagt
ctgccccttacaacggctctcccgtgacgcgctcccggactgatgggctgcctgtatcga
gtggtgattttgtgcccagctgcccggctcggggagctgttggctggctggggcaggatata
tgtggtgtaaacaaattgacgcttagacaacttaataacacattgcccagctttttaatgta
ctgaattaacgcgcaattaattcgggggatctggatttttagtactggattttggtttagga
attagaaattttattgatagaagtattttacaaatacaatacactaagggtttcttata
tgctcaacacatgagcgaaacctataggaaccctaattcccttatctgggaactactcaca
cattattatggagaaactcgagcttgctgatcgacagatcccggctcggcatctactctattt
ctttgccctcggacgagtgctggggcgtcgggttccactatcggcgagtagtctctacacagc
catcgggtccagacggcgcgcttctgcccggcagatttggtacgcccagcagctcccggctccg
gatcggacgattgctgcatcgaccctgcgcccagctgcatcatcgaaattgcccgtcaac
caagctctgatagagttggtaagaccaatgcccggagcatatacggcccggagctggtggcgatc
ctgcaagctccggatgcctccgctcgaagtagcgcgctctgctgctccatacaagccaaccac
ggcctccagaagaagatggtgggcagctcgtattgggaatccccgaacatcgctcgtcca
gtcaatgaccgctgttatgcccgcattgtccgctcaggacattgttggagccgaaatccgctg
gacagaggtgcccgacttccggggcagctcctcggcccaagcatcagctcgagagcctgc
gcgacggcagcactgacgggtgctcctcatcacagtttgccagtgatacacatggggatcagc
aatcgcgcatatgaaatcacgccatgtagtgattgaccgattccttgcgggtccgaaatgggc
cgaaccgctcgtctggctaagatcggccgcagcagatcgcatccatagcctccgcgacccggt
tgtagaacagcgggcagttcggtttcaggcagggtcttgcaacgtgacaccctgtgaaccggcg
ggagatgcaataggtcaggctctcgctaaactccccaatgtcaagcacttccggaatcggga
gcccggccgatgcaaagtgccgataaacataacgatctttgtgaaaccatcggcgcagcta
tttaccgcgaggacatatccacgcctcctacatcgaagctgaaagcagcagattcttccg
ctccgagagctgcatcaggctcggacacgctgtcgaacttttcgatcagaaacttctcgacag
acgtcgcggtgagttcaggcttttataagcttctgcaaaagagaaccagacaacagggta
agtgcctagcagtaaacaaacagaactcatcacaagcaaacagcaacatcatattcatacca
acaggtcatgtgttcatcacatcattagtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gtaagggcaagagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
catatcttcatctatcatgcatactatccataacaggacagatgatgttgaccaggtaaaa
gctacaggatcctataggaacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gtggcacatgcagtttcaatttaagcacatgagctagttgattatgaggtaccagagaatca
tcaactgatgtagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
aggaaaggtgtgctattcagttaaaagctaccgcatcatatacaaacggcagcagcagcagc
agcataatcatcttaatcatgcaacaaacgcagattcataataagcccaagagctagctgt
gatgatcttattctactctgatctacagcaatcagataacgacctaaccttgccatggcaa
caaaacaatcgatcggacgaatcagttgtttgttccctagctagcaccatcgaaccagataat
agatgcacgtacagatcccgaacgaaccccaaacagggcagacctagctgaacctaggc
agcgaaccagcagatcgtgagaacgatctcatctacgaacagcctagaagcaaccccacgat
tcccggacaaacgacctaaaatccccacaaatcacatgagcagcagcagcagcagcagcagc
ccgatcagatctacacgaaaaccccacctccagccacccacgatcaggaaacacgcggatc
tagcatgatttcgtcaacgcctcagcctagttcctagccacagaccaagcagaaccacccaaa
ccacgcccagcagagatggggcaagaggcagggggagacgatcggcgtaccttgaaagcgg
gggaaggatcgcgaggggtcgcgagggagagcaatttgatttggaaccggggggtgtgccc
tccgaacgatgagacgatgtgagattgtgggaagaggcggcggaggccctgtatttatgggc
tgcgacggggggaggagaggtggggaggggtgggggaaggaatccccacccgtgcccgtgacg
gttccgggcccgtgtgagaggagcccgcctcgtctccgccacgcaatttccgcgatcggagcgg
agctttcagagggcggctggatgggtgggtggccgttagattttgtagacgcccgttaacgcctc

gcctccaccgggaagagttttgagcagccgcttatgacaatggcttaacgacgtagacgga
gcgtagtgaggcaggccatgatagaatagacgtattgcaatgggattataattaataataa
gaatataataagatatggcaagtcggcactcatgacatggctctcgaaatgatagtgctcac
tttcttagccgagaaagttgacgcgactgatttagaagttaagatattttctctctctt
ttctttcctcgatataaggatgaaataaacttttagagattgccggtagtgattttggatt
tcggcgatcaggcttggtttgccggtttcggacggtgtgccttaggccaccccgagtgatc
ttgtaatgttcaaccgataagcaagggtggggctcaagcaagtagtaacaactatgtcaaa
tgtcaccatggttatggtcttgttttagttggcttcttggccgattcattaatgcagctggca
cgacaggtttcccgaactggaaagcgggcagtgagcgcaacgcaattaatgtgagtttagctca
ctcatttaggcaccccaggctttacactttatgcttccggctcgatgttgtgtggaattgtg
agcggataacaatttcacacaggaaacagctatgacatgattacgaattcgagctcggatcc
cggggtctgcaggcgcgtgcagcgtgacccggctcgtgcccctctctagagataatgagcat
tgcaggtctaagttataaaaaattaccacatatttttttggcacactgtttgagtgag
tttatctatctttatacatatatttaactttactctacgaataatataatctatagta
caataatcagtggttttagagaatcatataaatgaacagtttagacatggctctaaaggaca
ttgagtttttgacaacaggactctacagttttatcttttttagtggtgcatgtgttctctct
ttttttgcaaatagcttcacctatataataacttcatccattttatttagtacatccatttagg
gttttagggttaatggtttttatagactaatttttttagtacatctattttattctatttttag
cctctaaattaagaaaactaaaactctatttttagtttttttttttaataatttagatataaa
atagaataaaaataaagtgactaaaaattaacaaataaccctttaagaaatataaaaaactaa
ggaaacatttttcttgttttcgagtagataatgccagcctgttaaacgccgctgcagcagctca
acggacaccaaccagcgaaccagcagcgtcgcgtcgggccaagcgaagcagacggcagcggca
tctctgtcgtgcctctggacccctctcgagagttccgctccaccggtggacttgctccgct
gtcggcatccagaaattgcgtggcgggagcggcagcgtgagccggcagcggcagggcctcc
tctctctctcagcggcaccggcagctacgggggattcctttcccaccgctccttcgctttccc
ttcctcgcccgcgtaataaatagacacccccctccacaccctctttcccacactcggttg
ttcggagcgcacacacacacaaccagatctccccaaatccaccgctcggcacctccgcttc
aaggtagcgcgctcgtcctccccccccccccctctctaccttctctagatcggcgttccggt
ccatggtagggcccggtagttctacttctgcttcatggtttgtgttagatccggtgtttgtgt
agatccgctgctagcgttcgtacacggatgagcagcctgtacgtcagacacgttctgattgc
taacttgccagtgtttctctttggggaatcctgggatggctctagccgttccgcagcggga
tcgatttcatgattttttttgtttcggttgcataagggtttgggttgcccttttctttatttc
aatatatgccgtgcacttgtttgtcgggtcatcttttcatgctttttttgtcttgggtgtg
atgatgtggtctggttgggcggtcgttctagatcggagtagaattctggttcaaacactcctg
gtggattttattaattttggatctgtatgtgtgtgccatacatattcatagttacgaattgaa
gatgatggatggaaatcgcacttaggataggatatacatggtgatgcgggttttactgatgc
atatacagagatgctttttgttcgcttgggtgtgatgatgtggtgtggttgggcggtcgttc
attcgttctagatcggagtagaataactggttcaaacactcctgggtgattttattaattttgga
actgtatgtgtgtgtcatacatctcactagttacgagtttaagatggatggaaatcgcactc
taggataggatatacatggtgatgtgggttttactgatgcatacatagatggcagatgcagc
atctattcatatgctcctaaccttgagtacctatctattataataaacaagtatgttttataa
ttattttgatcttgatataacttggatgatggcatatgcagcagctatatgtggattttttta
gcctgccttcatacgtatattttgcttggactgtttcttttgcgatgctcaccctgt
tgtttggtgttacttctgcagactagagttatcaacaagtttgtaaaaaagctgccacca
tggcagatgccgatgctctctttccccggcaggcagccgctcctccccggccgcccacc
gccaccgctcctcctccccctctgcccgtcctcccccttctccgcccggcgaatggcgg
catgggggaggaggcggatggacgggagggtggatggcggaggccggtgcccttcacggcgg
cgcagtaggagctggagcaccaggcgtcatatacaagtagctggtggccggcgtgtcc
gtcccgcggatctcgtgctccccatccgcccggcatcagagtcctcgcggcccgttcta
ccacaacccccctgcctcgggtacggatcgtacctgggcaagaagggtggatccggagccgg
gccggtgcccgcgacggcaggaagaagtgccggtgcgccaaggaggccgctccgactcc
aagtattgcgagcggccacatgcaccgcccggcgaaccggttcaagaaagcctgtggaaacgca
gctcgtctcgcactcccagcggcggcggcctccgctcgtgcgcccctcggcaccggcttcc
acaaccactcctctaccccggcatcggcggcaccacgggtgggtggaggcggggggaacaac
ggcatgtccatgccggcagcttctcctccgctggggccgctcagcagcagatgggcaa
caatgccgctctccctacggcgtctcggcggcggcgaacatgcaaagatttcaggtata
ccgcatatggaataagatctttggcagacgagcagagtcagctcatgacagaagccatgaac
acctccgtggagaacctatggcgcctgcgcctatctctcaaacgactacattcccgtctc
aagctactctcctcagcttggagcaacgagtgacctgggtcagaacaacagcagcaacaaca
acagcggcgtcaaggcggaggacagcagcagcagcagccgctcctctcccgggggtgccc
gacttcggcagcggcagctccgcgaagcaggagaaccagacgctgcccgcttcttcgacga

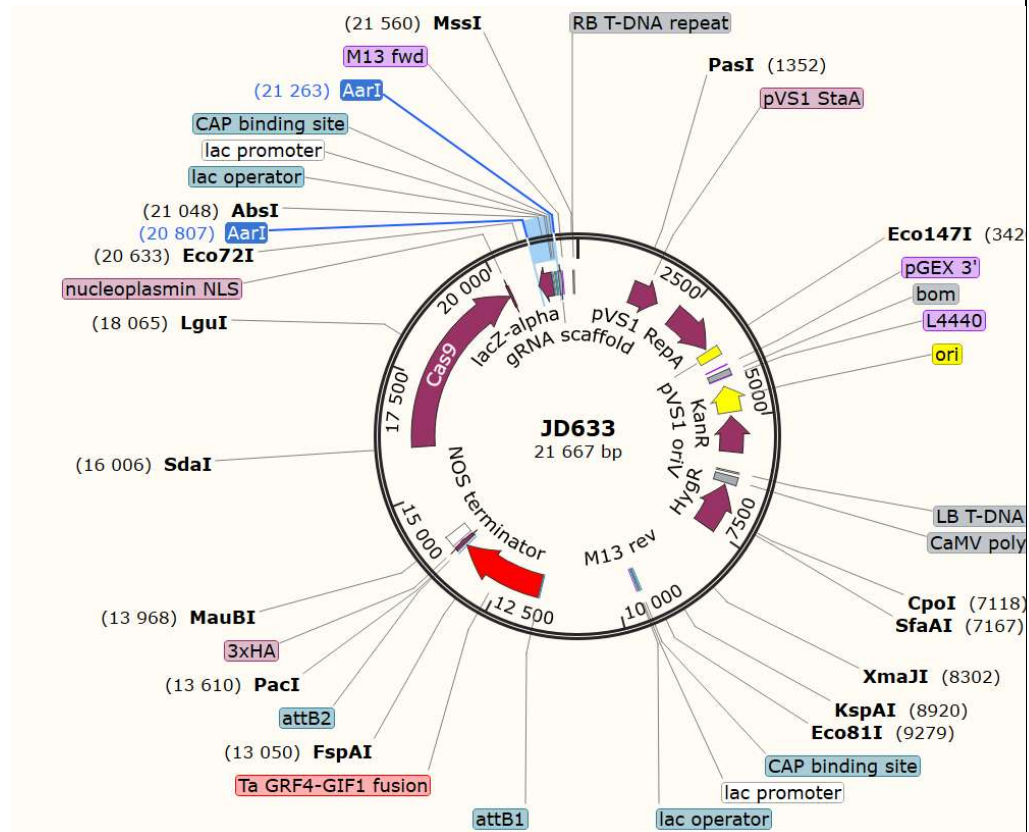
gtggccgaagacgagggactcgtggctggacctgaccgacgacaactcgaacgtcgcctcct
tctcggccaccagctgtcgtatctcgataccatgacgtcctccgacttctccgcccagc
tcccagtcgccaacggcatgctgttcgcggcgaatgtacgcgccgctgccatgcagca
gcaacacctgatgcagatgaaccagagcagatgatggggggctacgcttcttaccactgcca
ccactgatctcattcagcagctacctggatgagaacaagcagctgatccctggccatcctcgac
aaccagaacaacggcaaggtggaggagtgcgcacggaaccaagctaagctccagcagaacct
catgtacctcgcgcctatcgccgacagccagcctcccgagacggcatcgctgtctcagtagc
cgtccaacctgatgatgcagtccggggcgcgggtacatgcagcagcagctcggcgcagatgatg
tcgcccagtcgctgatggcgggcgcgggtcgtcgatgatgtacgcgacagggccatgtcgcc
gctccagcagcagcagcagcagcagcagccaggcggcgcgcacggccagctggggatgt
cctccggcgcgaccaccgggttcaacctcctgacgggtgagggccagcatgggcgcgggcgcg
ggcgcccaaggagggtcgacctcgtcgtcgccgacgctcgcggcggcggcgccgagcgcg
acagcggcgacggggagtacctcaagggcaaccgaggaggagggaaggaagctagcgttcagcttc
ttgtacaaagtggttgataacagcgggttaattaacatcttttaccatacagtgttcctga
ctatgcgggctatccctatgacgtcccgactatgcaggatcctatccatagacggtccag
attacgctgctcagtgacgcttagagctcgaatttccccgatcgttcaaacatttggcaa
taaagtttcttaagattgaatcctggtgcccgtcttgcgatgattatcatataatttctggt
gaattacggttaagcatgtaataattaacatgtaatgcatgacggttattatgagatgggttt
ttatgatgtagctcccgcaattatacatttaatacgcgatagaaaacaaatatagcgcgca
aactaggataaattatcgcgcgcggtgctatctatggtactagatcggggattagcgcgct
gcagtgcagcgtgaccgggtcgtgccccctccttagagataatgagcattgcatgtctaagtt
ataaaaaattaccacatattttttttgacacctgtttgaagtgcagtttatctatcttta
tacaatattttaaactttactctacgaataataatctatagtagtacaataatatcagtg
ttttagagaatcatataaatgaacaggttagacatggtctaaaggacaattgagttttgac
aacaggactctacagttttatcttttttagtggtgcatggttctccttttttttgcaaatag
cttccactatataataacttcatccattttatttagtagatccatttagggtttagggttaatg
gtttttatagactaattttttttagtacatctattttattctatttttagcctctaaattaaga
aaactaaaactctatttttagtttttttatttaataatttagatataaaataaaaataa
agtactaaaataaacaataaccctttaagaataaaaaaaactaaggaaacatttttct
tgtttcgagtagataatgcccagcctgtaaacgcgctcgacgagcttaacggacaccaacca
gcaaccagcagcgtcgcgctcgggccaagcgaagcagacggcaccggcatctctgctgcgtgcc
tctggaccctctcgagagttccgctccaccgttggacttgctccgctgctcggcatccagaa
attgcgtggcggagcggcagacgtgagcggcagcggcagggcctcctcctcctctcagcgg
caccggcagctacgggggattcctttcccaccgctccttcgctttccctcctcgcccgccg
taataaatagacacccccctccacacctctttccccaacctcgtggtggttcggagcgcacac
acacacaaccagatctcccccaatccaccgcgtcggcacctccgcttcaaggtagccgctc
gtcctccccccccctctctaccttctctagatcggcggtccgggtccatgggttagggccc
ggtagttctacttctgttcatgtttggttagatccgtggttgggttagatccgtgctgcta
gcgttcgtacacggatgcgacctgtacgtcagacacgcttctgattgctaacttgccagtggt
tctctttggggaatcctgggatggctctagccggtccgcagacgggatcgatctcatgattt
ttttggttctggtgcatagggtttgggttgccttttctttatattcaatataatgcccgtgca
cttgttctcggtgcatcttttcagcttcttttgctcttggttgatgatgtggtctgggt
tggggggtcgttctagatcggagtagaattaattctgtttcaaacacactcgtggattttatt
aattttggatctgtatggtggtgcacatataattcatagttacgaattgaagatgatggatg
gaaatcagatcaggataggtatacatgttgatgcgggtttactgatgcataacagaga
tgcttttggttcgcttgggttgatgatggtggttgggttgggctgcttattcgctctag
atcggagtagaataactggttcaaactacctgggtgatttattaatttttgaactgtagtggt
gtgtcatacatcttcatagttacgagtttaagatggatggaaatatacgatctaggataggta
tacaatgtgatggtggttttactgatgcataacatgatggcatatgcagcatctattcata
tgctctaaccttgagtagcttattataataaacaagtattttataatttttgatc
ttgatataacttggatgatggcagctatataatgggatttttttagccctgccttc
atacgtatattttttgcttggtactggttcttttgatgctcacctggttgggtggt
acttctcagggcagatctattcgaatggacaagaagtagtagcggcctcgacatcggga
cgaactcagttggctgggcccgtgacccgcagagtagcaaggtgccccttaagaagttcaag
gtcctgggggaacaccgaccgccattccatcaagaagaacctcatcggcgcctctcctgttcga
cagcggggagaccgctgaggctacgaggtcaagagaaccgctagggcggcgggtacacgagaa
ggaagaacaggatctgctacctccaagagatttttctccaacgagatggccaaggttgacgat
tcattcttccaccgctggaggagttcttctcgtggaggaggataagaagcagcagcgga
tcccctcttcggcaacatcgtggaagagggttgcctaccacgagaagtagcctacgatctacc
atctgcggaagaagctcgtggactccaccgataaggcggacctcagactgatctacctcgct

ctggcccacatgatcaagttccgcgggccatttctctgatcgagggggatctcaaccagacaa
cagcgatggtgacaagctgttccatccaactcgtgcagacctacaaccaactcttcgaggaga
acccgatcaacgcctctggcgtggacgcgaaggctatcctgtccgcgaggctctcgaagtc
aggaggctggagaacctgatcgctcagctcccaggcgagaagaagaacggcctgttcgggaa
cctcatcgctctcagcctggggctcaccocgaacttcaagtcgaacttcgatctcgctgagg
acgccaagctgcaactctccaaggacacctacgacgatgacctcgataacctcctggcccag
atcggcgatcaatacgcggacctgttccctcgctgccaagaacctgtcggacgccatcctcct
gtcagatctcctccgctgaaacccgagatcacgaaggctccactctctgcctccatgatca
agcgctacgacgagcaccatcaggatctgacctcctgaaggcgctgggtccgccaacagctc
ccggagaagtacaaggagatTTTTcttcgatcagtcgaagaacggctacgctgggtacatcga
cggcggggcctcacaagaggagttctacaagttcatcaagccaatcctggagaagatggacg
gcaacgggagctcctgggtgaagctcaacaggaggacctcctgcggaagcagagaaccttc
gataacggcagatccccaccaaatccatctcggggagctgcacgccatcctgagaaggca
agaggacttctaccctttcctcaaggataaacggggagaagatcgagaagatcctgacctca
gaatcccatactacgtcggccctctcgcgcgggggaactcaagattcgcttggtgacccgc
aagtctgaggagaccatcacgcgctggaacttcgaggagggtggggacaagggcgctagcgc
tcagtcgcttcatcgagaggatgaccaacttcgacaagaacctgcccaacgagaagggtgctcc
ctaagcactcgtcctgtacgagtacttaccgcttacaacgagctcacgaagggtgaagtac
gtcaccgagggcatgcgcaagccagcgttccctgtccggggagcagaagaaggctatcgtgga
cctcctgttcaagaccaaccggaagggtcacgggttaagcaactcaaggaggactacttcaaga
agatcgagtgcttcgattcggctcgagatcagcggcgttgaggaccgcttcaacgccagcctc
gggacctaccacgatctcctgaagatcatcaaggataaggacttccctggacaacgaggagaa
cgaggatctcctggaggacatcgctgctgacctcacgctgttcgaggacagggagatgatcg
aggagcgcctgaagacgtacgccatctcttcgatgacaagggtcatgaagcaactcaagcgc
cggagatacacggctgggggaggctgtcccgcaagctcatcaacggcatccgggacaagca
gtccgggaagaccatcctcgacttccctgaagagcgatggcttcgccaacaggaacttcatgc
aactgatccacgatgacagcctcaccttcaaggaggatatccaaaaggctcaagtgagcggc
cagggggactcgctgcacgagcatatcgcgaacctcgtggctcccccgatcaagaaggg
catcctccagaccgtgaagggtgtggacgagctcgtgaagggtcatgggcccgcacaagcctg
agaacatcgtcatcgagatggccagagagaaccaaccacgcagaaggggcaaaagactct
agggagcgcgatgaagcgcacgcagaggagggcatcaaggagctggggccccaaatcctcaagga
gcaccagtgaggagaacaccaactgcagaacgagaagctctacctgtactacctccagaacg
gcagggatattgtacgtggaccaagagctggatatacaaccgctcagcgttacgcgctcgat
catatcgttccccagctcttccctgaaggatgactccatcgacaacaaggctcctcaccaggtc
ggacaagaaccgcccgaagtcagataacgcttccatctgaggaggctcgttaagaagatgaaga
actactggaggcagctcctgaacgccaagctgatcacgcaaagggaagttcgacaacctcacc
aaggctgagagaggcgggctctcagagctggacaaggccggcttcatcaagcggcagctgg
cgagaccagacaaatcacgaagcacggttcgcaaatcctcgactctcggatgaacacgaagt
acgatgagaacgacaagctgatcagggagggttaagggtgatcaccctgaagtctaagctcgtc
tccgacttcaggaaggatttccagttctacaagggttcgcgagatcaacaactaccacatgc
ccatgacgcttacctcaacgctgtggctcggcaccgctctgatcaagaagtaaccxaaagctgg
agtcaggttcgtgtacggggactacaagggttacgatgtgcgcaagatgatcgccaagtcg
gagcaagagatcggcaaggctaccgccaagtaacttcttctactcaaacatcatgaacttctt
caagaccgagatcacgctggccaacggcgagatccggaagagaccgctcatcgagaccaacg
gcgagacgggggagatcgtgtgggacaagggcagggatttcgcgaccgtccgcaaggttctc
tccatgccccagggtgaacatcgtcaagaagaccgaggtccaaacgggcccgggttctcaaagga
gtctatcctgcctaagcggaaacagcagcaagctcatcgccagaaagaaggactgggacccaa
agaagtacggcgggttcgacagcctaccgctggcctactcggctcctgggttggtggcgaaggtt
gagaagggcaagtcacaagaagctcaagagcgtgaaggagctcctggggatcaccatcatgga
gaggtccagcttcgagaagaaccaatcgacttccctggaggccaagggtacaaggagggtga
agaaggacctgatcatcaagctcccgaagtaactctctcttcgagctggagaacggcaggaag
agaatgctggcttccgctggcgagctccagaaggggaacgagctcgcgctgccaaagcaagta
cgtgaacttctctacctggcttccactacgagaagctcaagggcagcccggaggacaacg
agcaaaagcagctgttcgtcgagcagcacaagcattacctcgacgagatcatcgagcaaatc
tccgagttcagcaagcgcgtgatcctcgcgcagcgcgaacctggataaggctcctctccgccta
caacaagcaccgggacaagccatcagagagcaagcgggagaacatcatccatctcttcacc
tgacgaacctcggcgtcctgctgctttcaagtaacttcgacaccacgatcgatcggaagaga
tacacctccacgaaggaggctcctggacgcgacctcatccaccagtcgatcaccggcctgta
cgagacgaggatcgacctctcacaactcggcggggataagagaccccgagcaaccaagaag
cagggcaagcaagaagaagaagtgactcgagatatgaagatgaagatgaaatatttgggtg
gtcaaaataaaaagcttgtgtgcttaagtttgtgttttttcttggcttgttgttgaat

| | |
|---------------|---|
| | <p>ttgtggcttttttctaataatgaatgtaagatcacattataatgaataaacaatgttt ctataatccattgtgaatgttttggtggatctcttctgcagcatataactactgtatgtgct atgggatggactatggaatatgattaaagataaggagctccggtgacggacgaccaagcccg ttattctgacagttctgggtgctcaacacatttatattatcaaggagcacattggtactcac tgctaggaggggaatcgaactaggaatattgatcagaggaactacgagagagctgaagataac tgccctctagctctcactgatctgggtcgcatagtgagatgcagcccacgtgagttcagcaa cggctctagcgtgggcttttagggcccgcatgatcgggcttttgtcgggtgggcgactggtc acgattggggagagcaacgcagcagttcctcttagtttagtcccacctcgccgtgcccagcag agttctgaccggtttataaaactcgcttgctgcatcagacttagaggcaggtgcccgtacagg gcgctgcccattcgccattcaggctgcgcaactggtgggaagggcgatcgggtcgggctct tcgctattacgccagctggcgaaagggggatggtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgcc agggttttcccagtcacgacggttgtaaaacgacggccagtgagcgcgcgtaataacgactcac tatagggcgaaattgggtaccgggccccccctcgaggctcctccagcttttggcccttttagtg agggttaattgctgcttggcgtaatacatggtcataagctggttctctggtgaaattggtatc cgctcacaattccacacaacatacagagcgggaagcataaaagtgtaaagcctgggggtgctaa tgagtgagctaaactcacattaattgcttgcgctcactgcccgtttccacctgcccgtgctt ttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtgccac cgagtcgggtgctttttttcccgggtggcactggccgctgcttttacaacgctgctgactgggaaa accctggcgttacccaacttaatcgcttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaaat agcgaagagggcccgcaccgatcgcccttcccaacagttgctgcagcctgaatggcgaatgcta gagcagcttgagcttgatcagattgctgctttcccgccttcagtttaactatcagtggttg acaggatatattggcgggtaaacctaagagaaaagagcgtttattagaataatcggatattt aaaagggcgtgaaaaggtttatccgttcg</p> <p>30.2.2.2. mobilizācijas biežumu un specifiskumu;</p> <p>Mobilizācija nenotiek</p> <p>30.2.3. tādu gēnu esību, kas piešķir rezistenci pret antimikrobiālām vielām, tostarp arī antibiotikām;</p> <p>Rezistence pret higromicīnu B, ko piešķir higromicīna fosfotransferāzes gēns no <i>E. coli</i> (Gritz and Davies, 1983).</p> <p>30.2.4. donora mikroorganismu loku;</p> <p>Donora protospeisera sekvences tiks iegūtas no auga <i>Lolium perenne</i> (daudzgadīgā aīrene).</p> <p>30.2.5. citas būtiskas fizioloģiskās īpašības;</p> <p>Nav</p> |
| 30.3. Inserts | <p>Ļoti īsi apraksta visus apakšpunktus par insertu</p> <p>30.3.1. inserta identitāti, nukleotīdu secību un inserta funkcijas (gēnu);</p> <p>Oligonukleotīdu protospeisera sekvences daudzgadīgās aīrenes CBP60g gēnam, kurš piedalās augu imūnās atbildes regulēšanā (Kim et al., 2022): sense oligo</p> <p>ACTTGAACATGTCCTTCTACAGCA</p> <p>ACTTCTTCTACAGCACGGAGGAGC</p> <p>ACTTGGGGGATCCGTACCTTGAAG</p> <p>ACTTGGGGGATCCGTACCTTGAAGA</p> <p>ACTTTGGCGTCCCTCTTCAAGGTA</p> |

| | |
|---|--|
| | <p>ACTTCGCGTCGCCGACGGTGTATG</p> <p>30.3.2. insertētā ģenētiskā materiāla izpausmes pakāpi;</p> <p>Insertētais ģenētiskais materiāls tiks ekspresēts, kā CRISPR sgRNS molekula, kura kompleksā ar Cas9 nukleāzi sašķels mērķa sekvenci daudzgadīgās airesnes protoplastu kultūras genomā. Genoma rediģēšanas rezultātā sagaidāms, ka tiks traucēta daudzgadīgās airesnes mērķa gēna ekspresija un funkcija.</p> <p>30.3.3. ģenētiskā materiāla avotu, donora mikroorganisma identitāti un attiecīgā gadījumā – raksturlielumus;</p> <p>Genoma rediģēšanai izmantotā pJD633 plazmīda satur ģenētiskos elementus no <i>E. coli</i>, <i>Agrobacterium tumefaciens</i>, kviešiem <i>Triticum aestivum</i> un <i>Streptococcus pyogenes</i>, kā arī sintētiskas konstrukcijas klonēšanai. sgRNS protospeisera sekvences atbilst daudzgadīgās airesnes gēnu sekvencēm.</p> <p>30.3.4. iepriekšējo ģenētisko modifikāciju vēsturi;</p> <p>Nav bijušas</p> <p>30.3.5. ievietotā ģenētiskā materiāla atrašanās vietu recipienta genomā (norādīt, vai insertētais materiāls aktivizē/deaktivizē recipienta mikroorganisma gēnus);</p> <p>Plazmīdas pJD633 T-DNS rajons, kurā klonēts sgRNS protospeiseris tiks tranzienti ekspresēts daudzgadīgās airesnes protoplastu kultūrā bez integrācijas genomā. Ekspresijas rezultātā tiks sintezēta sgRNS un Cas9 nukleāze, kas izveidos ribonukleoproteīnu kompleksu ar divpavedienu DNS šķelšanas aktivitāti, kas rezultātā inaktivēs specifisku daudzgadīgās airesnes gēnu.</p> |
| <p>30.4. Veiktors <i>pE_T</i></p> | <p>30.4.1. vektoru veidu, nukleotīdu secību un izcelsmi;</p> <p>Aprakstīts 30.2.2 punktā</p> <p>30.4.2. struktūru un paredzēto vektoru daudzumu, un donora mikroorganisma atlikušās nukleīnskābju sekvences gala ģenētiski modificētā mikroorganisma konstrukcijā;</p> <p>Plazmīdas vektors pJD633 satur sekojošus ģenētiskos elementus: <i>E. coli</i> replikācijas oridžins ColE1 (Helinski et al., 1996); pVS1 replikācijas oridžins plazmīdas replikācijai <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Itoh et al. 1984); Kanamicīna rezistences gēns ar promoteru; Plazmīdas T-DNS rajons satur <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti plazmīdu LB un RB rajonus. Starp LB un RB ir ievietoti sekojoši ģenētiskie elementi: Higromicīna B ekspresijas kasete ar <i>E.coli lac</i> promoteru un CaMV poly(A) signālu; GRF4-GIF1 ekspresijas kasete ar natīvo promoteru un <i>A. tumefaciens nos</i> terminatoru un poly(A) signālu;</p> |

Cas9 ekspresijas kasete optimizēta ekspresijai viendīgļlapjos, kas satur arī nukleoplazmīna kodola lokalizācijas signālu;
 Protospesera klonēšanas vietu starp diviem *AarI* saitēm, kas satur *lac* promoteru un *lacZ* alfa peptīda kodējošo sekvenci, kas atļauj rekombinanto plazmīdu atlasīšanu ar selekciju uz X-Gal substrāta;
 Gala ģenētiski modificētā organismā (daudzgadīgās aieres protoplastu kultūras) šūnās nonāks viss vektors, taču tranzienti ekspresēsies tikai tie gēni, kas satur augiem specifiskus promoterus, tādā veidā sgRNS, Cas9, GRF4-GIF1 un higromicīna B fosfotransferāze.



No donora organisma daudzgadīgās aieres plazmīdu vektorā tiks ievietotas tikai protospesera sekvences, kas minētas 30.3.1. punktā.

30.4.3. vektora mobilizācijas biežumu un spēju pārnest ģenētisko materiālu, ja galīgajā ģenētiski modificētajā mikroorganismā ir ievietots vektors

Nav attiecināms – vektors neievietojas hromosomā.

| | |
|-------------------------|--|
| 30.5. Ģenētiski modifēt | <p>Ļoti īsi apraksta visus apakšpunktus par gala rezultātā iegūto ģenētiski modificēto mikroorganismus</p> <p>30.5.1. attiecībā uz cilvēku veselību:</p> <p>Gala rezultātā iegūtā protoplastu kultūra, kurā tranzienti ekspresējas plazmīdas pJD633 T-DNS ar klonēto protospesera sekvenci nevar ietekmēt cilvēka veselību, jo nav informācijas par informācijas par atsevišķu ģenētisko</p> |
|-------------------------|--|

| | |
|--|--|
| <p>ais mi kro org ani sm s</p> | <p>elementu vai to kombināciju kaitīgo ietekmi. Jāņem vērā, ka eksperimenta rezultātā iegūtie genomiski rediģētie protoplasti nevar reģenerēties par augiem un pēc eksperimenta noslēguma tie tiks likvidēti. Protoplastu kultūras tiks ražotas nelielos tilpumos (<10 ml) un uzturētas sterilos apstākļos noslēgtā mēģenē.</p> <p>30.5.1.1. ģenētiski modificētā mikroorganisma un tā metabolisko produktu toksisko vai alergisko iedarbību;</p> <p>Nav konstatēta</p> <p>30.5.1.2. ģenētiski modificētā mikroorganisma patogenitāti salīdzinājumā ar recipienta un vecāku mikroorganismu;</p> <p>Nav izmainīta</p> <p>30.5.1.3. ģenētiski modificētā mikroorganisma kolonizācijas spēju;</p> <p>Kolonizācijas spēja nepiemīt</p> <p>30.5.2. attiecībā uz ģenētiski modificēto mikroorganismu, kas ir patogēns cilvēkiem ar pavājinātu imūnsistēmu:</p> <p>30.5.2.1. izraisītās slimības, izplatības un virulences pārmešanas mehānismus;</p> <p>Nav</p> <p>30.5.2.2. inficējošo devu;</p> <p>Nav attiecināms</p> <p>30.5.2.3. iespējamās izmaiņas inficēšanas ceļā vai audu specifiskumu;</p> <p>Nav</p> <p>30.5.2.4. izdzīvošanas iespējas ārpus cilvēka mikroorganisma;</p> <p>Ģenētiski modificētais organisms spēj izdzīvot tikai laboratorijas apstākļos audzējot specializētās augu šūnu kultūru barotnēs.</p> <p>30.5.2.5. bioloģisko stabilitāti;</p> <p>Bioloģiskā stabilitāte nav izmainīta attiecībā pret recipienta organismu</p> <p>30.5.2.6. rezistences spektru pret antibiotikām;</p> <p>Rezistence pret kanamicīnu (baktērijas) un higromicīnu (protoplasti)</p> <p>30.5.2.7. alergēniskumu;</p> |
|--|--|

| |
|--|
| Nav |
| 30.5.2.8. toksiskumu; |
| Nav |
| 30.5.2.9. piemērojamās terapijas un profilaktisko pasākumu esību; |
| Nav nepieciešama |
| 30.5.3. attiecībā uz vidi: |
| 30.5.3.1. ekosistēmas, kurās ģenētiski modificētais mikroorganisms varētu nejauši izplatīties ārpus ierobežotas izmantošanas; |
| Kanalizācijas notekūdeņi, taču jāņem vērā, ka protoplastu kultūras tiks apstrādātas ar nātrija hipohlorīta balinātāju, kas ne tikai nogalina augu šūnas, bet arī bojā DNS, tādējādi novēršot rekombinantās DNS nokļūšanu vidē. |
| 30.5.3.2. ģenētiski modificētā mikroorganisma dzīvotspēju, vairošanos un izplatības apjomus noteiktajās ekosistēmās; |
| Iegūtais GMM nespēj apkārtējā vidē konkurēt ar dabisko <i>E. coli</i> , tādēļ tā iespējamā izplatība kanalizācijas sistēmās būtu ļoti ierobežota. K-12 celma atvasinājumi ir auksotrofi, attiecīgi to izdzīvošanai nepieciešams nodrošināt barības vielu klātbūtni, kāda nav pieejama dabiskos apstākļos. K-12 celma atvasinājumi nespēj kolonizēt cilvēka zarnu traktu (Smith, 1975). |
| Savukārt genomiski rediģētā protoplastu kultūra ir pilnībā atkarīga no kultivēšanas sterilā vidē ar noteiktām barības vielām. Kultūrai nepiemīt spēja reģenerēties par veselu augu un pēc eksperimenta beigām tā tiks likvidēta apstrādājot ar nātrija hipohlorīta balinātāju. |
| 30.5.3.3. paredzamo rezultātu, ja ģenētiski modificētais mikroorganisms nejauši izklūst ārpus ierobežojošajiem pasākumiem un mijiedarbojas ar citiem mikroorganismiem; |
| Nav paredzama nekāda kaitīga ietekme |
| 30.5.3.4. kaitīgo vai iespējamo kaitīgo ietekmi uz augiem vai dzīvniekiem; |
| Nav |
| 30.5.3.5. zināmo vai iespējamo dalību bioģeoķīmiskajos procesos. |
| Nav |

Literatūras atsauces

1. Bachmann BJ (1996) Derivation and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. In: Neidhardt et al., eds. ASM:2460-2488
2. Debernardi JM, Tricoli DM, Ercoli MF, Hayta S, Ronald P, Palatnik JF, Dubcovsky J (2020) A GRF–GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nature Biotechnology*
3. Gritz L, Davies J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25:179-188
4. Helinski DR, Toukdarian AE, Novick RP (1996) replication control and other stable maintenance mechanisms of plasmids. In: Neidhardt et al., eds. ASM:2295-2324
5. Itoh Y, Watson JM, Haas D, Leisinger T (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11:206-220
6. Kim JH, Castroverde CDM, Huang S, Li C, Hilleary R, Seroka A, Sohrabi R, Medina-Yerena D, Huot B, Wang J, Nomura K, Marr SK, Wildermuth MC, Chen T, MacMicking JD, He SY (2022) Increasing the resilience of plant immunity to a warming climate. *Nature*
7. Ledford H (2008) How does bleach bleach? *Nature*
8. Nilsson M, De Maeyer H, Allen M (2022) Evaluation of Different Cleaning Strategies for Removal of Contaminating DNA Molecules. *Genes (Basel)* 13
9. Smith HW (1975) Survival of orally administered *E. coli* K12 in alimentary tract of man. *Nature* 255:500-502