

Ģenētiski modificētu mikroorganismu (ĢMM) ierobežotas izmantošanas riska novērtējuma kopsavilkums darbam Latvijas Organiskās sintēzes institūta biotehnoloģiju laboratorijā

Darbība: *E. coli* K12 un B celmu derivāta transformācija ar cirkulāriem dubultpavediena DNS plazmīdu vektoriem, kas paredzēti proteīnu ekspresijai un satur dažādus pētniecībai paredzētu proteīnu kodējošu gēnu insertus

Zinātniskās institūcijas numurs: 181038

Reģistrācijas datums: 12.01.2006

Adrese (juridiskā un faktiskā): AIZKRAUKLES IELA 21, RĪGA, LV-1006

Atbildīgā persona:

Dr Teodors Panteļejevs

Pētnieks

Doktora grāds (PhD) bioķīmijā

+371 26185769, teodors.pantelejevs@osi.lv

Zinātniskā institūcija paziņo, ka ierobežotai izmantošanai paredzētajam ĢMM nepiemīt MK noteikumu Nr.784 "Ģenētiski modificēto mikroorganismu ierobežotas izmantošanas, kā arī atļaujas izsniegšanas un anulēšanas kārtība" 29. punktā noteiktās kaitīgās īpašības.

1. Ierobežotās izmantošanas darbības:

E. coli K12 un B šūnu celmu derivāta transformācija ar cirkulāriem dubultpavediena DNS plazmīdu vektoriem, kas paredzēti proteīnu ekspresijai un satur dažādus pētniecībai paredzētu proteīnu kodējošu gēnu insertus.

2. Drošības klase:

Ģenētiskajā modifikācijā iesaistītiem materiāliem un ģenētiskās modifikācijas rezultātā iegūtiem organismiem nepiemīt kaitīgās īpašības, kas varētu izraisīt cilvēku, dzīvnieku vai augu slimības un radīt apdraudējumu apkārtējai videi, tādēļ paredzētās veicamās darbības un iegūtie ģenētiski modificētie organismi atbilst **pirmajai drošības klasei**.

3. Ģenētiskajās modifikācijās iesaistīto materiālu kaitīgās un iespējamās kaitīgās īpašības

3.1. Recipienta organisms

Escherichia coli* celmi, kas atvasināti no celmiem B un K-12.** Ģenētiskajās modifikācijās izmantotie *E. Coli* celmi uzskaitīti pielikuma tabulā ***Celmi.

1) Patogenitāte, toksiskums, alergēniskums

B un K-12 celmiem un to derivātiem ir būtiski samazināta vai pilnībā zudusi spēja kolonizēt cilvēka vai dzīvnieku gremošanas traktu, kā arī būtiski samazinās toksīnu producēšanas spējas.^{1,2} Šie celmi neizraisa apdraudējumu cilvēku vai dzīvnieku veselībai. Tie tiek lielos apmēros izmantoti biofarmācijā un biotehnoloģiju industrijā dažādu proteīnu ražošanai un atbilst pirmajai drošības klasei. Literatūrā nav atrodamas ziņas par šo celmu izraisītām infekcijām fermentācijas darbiniekiem.

E. coli celmiem, kas atvasināti no K-12 un B celmiem, ir vairāki šūnapvalka defekti, kas novērš tā spēju kolonizēt cilvēka vai dzīvnieku gremošanas traktu. Tie nespēj uz šūnas virsmas producēt glikokaliksu, kas nodrošina saistīšanos ar cilvēka vai dzīvnieku

gļotu audiem. K-12 celmi neekspresē kapsuloāro (K) antigēnu, kas ir nozīmīgs zarnu trakta kolonizācijai.³

E. coli celmi, kas atvasināti no B vai K-12 celmiem, nespēj veidot savvaļas tipa *E. coli* toksīnus tādā apjomā, kas varētu ietekmēt veselību.^{1,4}

2) Spēja radīt traucējumus profilaktisku vai ārstniecisku darbību norisei

Atsevišķi *E. coli* K-12 un B celmu derivāti var saturēt antibiotiku rezistences gēnus (kanamicīna, ampicilīna, tetraciklīna hloramfenikola), kas nodrošina to selektīvu pavairošanu laboratorijas apstākļos. Šo antibiotiku rezistences faktoru izplatības iespēja ir maza, ņemot vērā organisma zemo spēju nekontrolēti izplatīties vidē (sk. 3.1.(4)).

3) Spēja radīt kaitīgas sekas cilvēku un dzīvnieku veselībai vai videi

E. coli celmi, kas atvasināti no B un K-12, nespēj veidot savvaļas tipa *E. coli* toksīnus tādā apjomā, kas varētu ietekmēt veselību. Tie satur mutācijas, kuru rezultātā šie celmi ir zaudējuši savvaļas tipa *E. coli* piemītošo patogēniskumu, tādēļ tie neapdraud cilvēku un dzīvnieku veselību. Šie celmi ir nenoturīgi dabā.²

4) Spēja nekontrolēti izplatīties vidē

E. coli savvaļas tipa baktērijas dabā sastopamas zīdītāju taisnajā zarnā, to optimāla augšanas temperatūra ir 37°C. *E. coli* Celmi B un K-12, kā arī to derivāti, ir zaudējuši spēju kolonizēt zarnas un nespēj tajās ilgstoši izdzīvot. To spējas izplatīties vidē ārpus saimniekorganisma ir ļoti zema. Pētījumā, kur *E. coli* HB101 (K-12 derivāts) tika inokulēts nesterilā augsnē, tas nav detektējams pēc 21 dienām.⁵ *E. coli* baktērijas nespēj izplatīties sālsudenī. *E. coli* baktērijas nespēj izplatīties gaisā aerosola vai daļiņu formā un zaudē dzīvotspēju nepietiekama mitruma, UV starojuma, un zemas temperatūras ietekmē.³ Daudzi no *E. coli* K-12 un B derivātiem ir auksotrofi, līdz ar to tiem ir stingras prasības pēc konkrētām uzturvielām, kas dabā nav sastopamas pietiekamos daudzumos. Ņemot vērā šīs īpašības, nav pamata uzskatīt, ka *E. coli* celmi B un K-12 un to derivāti ir spējīgi izdzīvot ārpus to kultivēšanai speciāli paredzētām barotnēm un kontrolētas vides.

E. coli celmi B un K-12, kā arī to derivāti, nesatur tādas pazīmes, kas dotu šiem celmiem priekšrocības, salīdzinot ar dabiskajiem augsnes un ūdens mikroorganismiem, tādēļ to nekontrolētas izplatīšanās iespēja vidē ir nebūtiska.

5) Spēja pārvietoties citos organismos vai integrēt savu ģenētisko materiālu nekontrolētas izplatīšanās laikā

E. coli celmi B un K-12, kā arī to derivāti, nespēj inficēt citus organismus un tajos vairoties, līdz ar ko ģenētiska materiāla pārneses varbūtība uz citiem organismiem ir nenozīmīga. Pastāv varbūtība horizontālai gēnu pārnesei, piemēram, caur konjugāciju, tomēr, ņemot vērā šo celmu zemo dzīvotspēju ārpus kontrolētiem apstākļiem, tā ir maznozīmīga.

3. 2. Inserti

1) Patogenitāte, toksiskums, alergēniskums

Insertos izmantotās DNS fragmentu sekvences iegūtas no daudzveidīgiem dabā sastopamiem organismiem un kodē dažādus proteīnu produktus, kurus paredzēts pārekspresēt ģenētiski modificētajā organismā pētnieciskiem nolūkiem. Inserti tiek iegūti sintētiskā veidā no komerciāliem piegādātājiem vai ar polimerāzes ķēdes reakciju (PCR). Šie gēni vai to proteīnu produkti nav toksiski, patogēni un/vai alergēni.

Spēja radīt traucējumus profilaktisku vai ārstniecisku darbību norisei

Ģenētiskajās modifikācijā izmantotie inserti nesatur antibiotiku rezistences gēnus.

2) Spēja radīt kaitīgas sekas cilvēku un dzīvnieku veselībai vai videi

Ģenētiskajā modifikācijā izmantotie inserti nesatur gēnus, kas būtu saistīti ar modificētā organisma patogēniskumu vai kas radītu modificētajam organismam priekšrocības dabiskā vidē, tādēļ tas neapdraud cilvēku un dzīvnieku veselību vai vidi.

Šo insertu proteīnu produktiem nav negatīvu efektu uz cilvēka veselību, to sistēmiska nonākšana cilvēka organismā ir mazticama proteīnu lielās molekulārās masas dēļ, kas limitē to difūziju šūnās.

3) Spēja nekontrolēti izplatīties vidē

Insertu gēni vai to proteīna produkti nesatur ģenētisko materiālu, kas ļautu tam mobilizēties vai inkorporēties citos organismos, tādēļ tā izplatība vidē ir tieši atkarīga no nesējorganisma vai vektora īpašībām. Inserti nepiešķir transformētajiem organismiem tādas īpašības, kas atšķirtos no savvaļas tipa organismiem, tādēļ inserts nedos ģenētiski modificētajam organismam priekšrocības salīdzinājumā ar dabiskajiem augiem. Insertu proteīnu produkti nav spējīgi pavairoties.

5) Spēja pārvietoties citos organismos vai integrēt savu ģenētisko materiālu

Inserts nesatur ģenētiskos elementus, kas ļautu tam mobilizēties vai inkorporēties citos organismos. Izmantotie vektori (skatīt zemāk) arī nesatur elementus, kas veicinātu to mobilizāciju un pārnesi uz citiem organismiem.

6) Fenotipiskā un ģenētiskā stabilitāte

Visi ģenētiskajā modifikācijā izmantotie gēnu inserti vai to proteīnu produkti būtiski neietekmē modificētā organisma fenotipu. Tiem nav raksturīga spēja strauji iegūt jaunas mutācijas un tie nepiešķir šādas īpašības transformētajam organismam.

3.3. Vektors

Ģenētiskajās modifikācijās izmantoti dažādi dubultpavediena DNS plazmīdu vektori, kas satur vismaz sekojošus elementus:

- Replikācijas sākumu (*ori*)
- Klonēšanas vietu (multiple cloning site), kas paredzēta inserta ievietošanai
- Antibiotiku rezistences kaseti: kanamicīna, tetraciklīna, ampicilīna, hloramfenikola
- Transkripcijas promoteri, piemēram, T7, laktozes vai arabinozes promoteri.
- Transkripcijas terminatoru
- Ribosomas saistības vietu (RBS)

Vektori organismā tiek ievadīti izmantojot siltuma šoka (*heat shock*) vai elektroporācijas metodi. *E coli* šūnā tie uztur salīdzinoši nemainīgu kopiju skaitu (10-1000), kas atkarīgs no konkrētā vektora replikācijas sākuma (*ori*) sekvences.

Ģenētiskajās modifikācijās izmantotie vektori uzskaitīti pielikuma tabulā *Vektori*.

1) Patogenitāte, toksiskums, alergēniskums

Ģenētiskajās modifikācijās izmantotie vektori nesatur gēnus, kas būtu saistīti ar patogenitāti, vai kuru proteīnu produkti būtu toksiski vai alergēni.

2) Spēja radīt traucējumus profilaktisku vai ārstniecisku darbību norisei

Vektori satur dažādu antibiotiku rezistences gēnus: kanamicīna, tetraciklīna, ampicilīna, hloramfenikola, kas nepieciešami šo vektoru selekcijai šūnās. Šo rezistences elementu pārnese uz citiem, cilvēkam patogēniem organismiem, ir mazticama, jo 1) vektoriem nav mobilizācijas elementu, kas sekmētu to pārnesi uz citām baktērijām 2) transformācijās izmantotie *E. coli* celmi nespēj izplatīties ārpus kontrolētiem laboratorijas apstākļiem. Tādēļ iespēja, ka ģenētiskajā modifikācijā izmantotais vektors varētu radīt traucējumus profilaktisku vai ārstniecisku darbību norisei, uzskatāma par nebūtisku.

3) Spēja radīt kaitīgas sekas cilvēku un dzīvnieku veselībai vai videi

Ģenētiskajā modifikācijā izmantotie vektori nesatur gēnus, kas būtu saistīti ar modificētā organisma patogēniskumu vai kas radītu modificētajam organismam priekšrocības dabiskā vidē, tādēļ tas neapdraud cilvēku un dzīvnieku veselību vai vidi.

5) Spēja nekontrolēti izplatīties vidē

Izmantoto vektoru spēja nekontrolēti izplatīties vidē ir atkarīga no modificētā organisma. Ņemot vērā, ka transformācijā izmantotie *E. coli* celmi neizplatās vidē, arī vektoriem šādas spējas ir mazticamas.

6) Spēja pārvietoties citos organismos vai integrēt savu ģenētisko materiālu

Transformācijās izmantotie vektori nesatur citu organismu replikācijas sākuma (*ori*) saitu, tāpēc to spēja pavairoties citos organismos ir maznozīmīga. Vektori nesatur ģenētiskos elementus, kas ļautu tam mobilizēties vai inkorporēties citos organismos.

4 Ģenētiski modificētā organisma kaitīgās un iespējami kaitīgās ietekmes noteikšana

4.1. Recipienta organisms

1) Patogenitāte, virulence, spēja inficēt, alergēniskums, toksicitāte un slimību pārneses vektori

E. coli celmi B un K-12, kā arī to derivāti, nespēj inficēt citus organismus un tie nav toksiski. Tie nepārnēsā citas slimības. *Escherichia* ģints baktērijas nav augu patogēni.

2) Iepriekš veiktās ģenētiskās modifikācijas

Celms	Genotips
B	<i>lon dcm malB</i>
K-12	WT

3) Donoru organismu loks

Transformācijās izmantotajiem insertiem ir plašs donoru organismu loks: baktērijas, dzīvnieki, augi, vīrusi.

4) Nozīmīgākās fizioloģiskās īpašības, kas varētu tikt mainītas galīgajā ģenētiski modificētajā organismā

E. coli netiks novērotas nozīmīgas fizioloģiskas izmaiņas. Proteīnu pārkekspresēšanas eksperimentos *E. coli* augšanas ātrums mēdz samazināties.

5) Dabiskais biotops

E.coli ir zīdītāju resnās zarnas mikrofloras baktērija.

6) Līdzdalība, kas nozīmīga vides procesos

E.coli nav nozīmīgas līdzdalības vides procesos.

7) Mijiedarbība ar citiem organismiem vidē un tās sekas

E.coli celmi B un K-12 nav mijiedarbību ar citiem organismiem, jo tie ir zaudējuši spēju kolonizēt zīdītāju zarnu traktu.

8) Spēja veidot struktūras, kas nepieciešamas dzīvības saglabāšanai

E.coli neveido sporas, tādēļ jebkādi dezinfekcijas un sterilizācijas pasākumi, kas nogalina dzīvas šūnas, nodrošina pilnīgu atbrīvošanos no *E.coli*.

4.2. Inserti

1) Identitāte, nukleotīdu secība un inserta funkcijas

Paredzēts izmantot daudzveidīgus insertus ar atšķirīgām nukleotīdu sekvencēm un funkcijām.

Zemāk norādīts piemērs klonēšanas eksperimentā izmantotam **LecB** gēna insertam:

LecB ir *P. aeruginosa* virsmas (ārējās membrānas) proteīns, kas kalcijs atkarīgā veidā saista ogļhidrātus, polisaharīdus un ārējās membrānas proteīnu. Tas pieder pie proteīnu lektīnu klases.

LecB nukleotīdu secība:

```
ATGGCAACACAAGGAGTGTTCACCCTTCCCGCCAACCCAGTTCGGCGTCAACCGCCTTCGC  
CAACTCGGCCCGAAACCCAGACGGTGAACGTGCAGGTCAACGAAACCGTCGCGACCTTCACC  
GGGCAAAGCACCAACAACGCCATCATCGGCAGCAAGGTGCTCAACTCGGGCGGCGCGGCA  
AGGTGCAGATCCTGTCAGCGTCAATGGCCGCTCTTCGGATCTGGTTTCGGCGCAGGTGATCC  
TGGCCAATGAGCTGAACTTCGCCCTGGTCGGCTCTGAAGACAGCACCGACACGACTACAAC  
GACGCCGTCGTGGTGATCAACTGGCCGCTCGGCTAG
```

2) Inserta izpausmes pakāpe

Insertu gēnu pārekspresēšanai plānots izmantot *lac* operonu ar T7 promoteru vai arī *ara* operonu ar arabinozes promoteru. Gēna inducēšanu kontrolē ar IPTG, laktozi vai arabinozi.

3) Ģenētiskā materiāla avots, donora organisma identitāte

Inserti tiek iegūti sintētiski, iegādājoties to no komerciāla piegādātāja, vai ar polimerāzes ķēdes reakciju (PCR), izmantojot donora organisma DNS. Insertu donoru organismu loks ir plašs un ietver dzīvniekus, augus, baktērijas un vīrusus.

4) Iepriekšēja ģenētisko modifikāciju vēsture

Iegūtie konstrukti var saturēt mutācijas lasīšanas rāmī (*open reading frame*), kas nosaka ekspresētā proteīna aminoskābju atlikumu sekvenci. Piemēram:

- Mutācijas proteīnu funkcionālu īpašību noteikšanai, piemēram, izmantojot alanīna mutagenēzi (*alanine mutagenesis*), delēcijas vai aizvietojumus.
- Mutācijas enzīmu aktivitātes uzlabošanai, piemēram, enzīmiem ar biotehnoloģisku pielietojumu.
- Mutācijas proteīnu strukturālo īpašību vai termostabilitātes uzlabošanai.
- Šķīdību un ekspresiju uzlabojošas birkas (*fusion tag*)

5) Ievietotā ģenētiskā materiāla atrašanās vieta recipienta genomā

Transformācija notiek izmantot *heat shock*, jeb siltuma šoka metodi, kuras rezultātā pēc transformācijas inserts paliek plazmīdas formā, *E.coli* citoplazmā, taču netiek integrēts recipienta genomā.

4.3. Vektori

1) Vektora veids, nukleotīdu secība un izcelsme

Modifikācijā izmantotie vektori ir dubultpavedienu cirkulāras DNS plazmīdas, kas atvasinātas no dažādām priekšteču plazmīdām un satur dažādus *E. coli* replikācijas sākumus (*ori*), līdz ar to tiem nav vienotas pamata (*backbone*) sekvenču. Vektori satur vismaz sekojošus elementus:

- Replikācijas sākumu (*ori*)
- Klonēšanas vietu (*multiple cloning site*), kas paredzēta inserta ievietošanai
- Antibiotiku rezistences kaseti: kanamicīna, tetraciklīna, ampicilīna, hloramfenikola
- Transkripcijas promotori, piemēram, T7, laktozes vai arabinozes promotori.
- Transkripcijas terminatoru
- Ribosomas saistības vietu (RBS)

Vektori nesatur mobilizācijas sekvenču, kas sekmētu to pārnešanu uz citām baktērijām.

2) Vektora struktūra, paredzētais vektora daudzums un donora organisma atlikušās nukleīnskābes sekvenču GMO konstrukcijā

Vektora daudzums, kas izmantots transformēšanai ar *heat shock* vai elektroporāciju ir 1 nanogramms līdz 10 mikrogrammi. Pēc transformācijas, *E. coli* šūnā vektoru kopiju skaits ir 5-1000, atkarībā no vektora *ori* sekvenču.

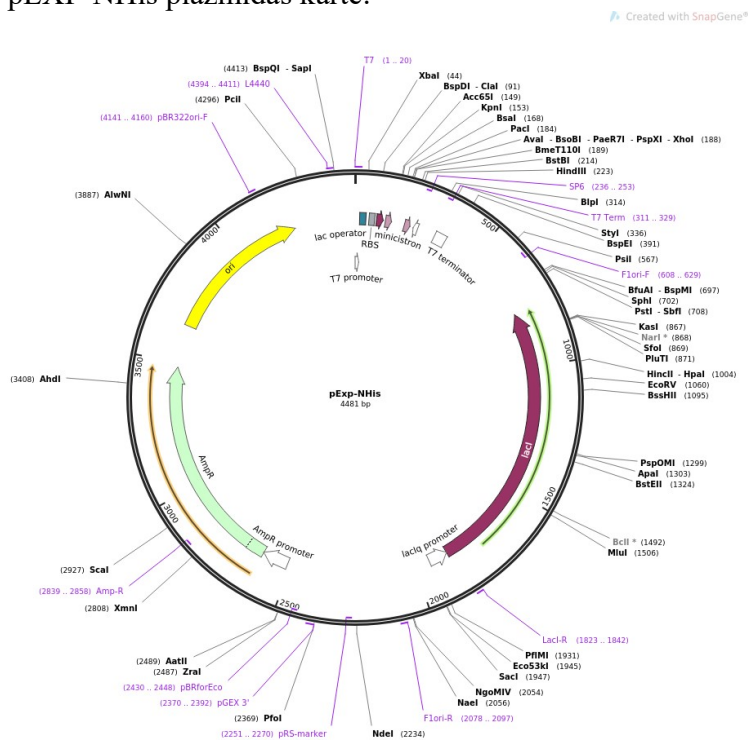
Piemērs: pEXP-NHis vektors (Addgene #112558) proteīnu ekspresijai ar N-terminālu polihistidīna iezīmi.

pEXP-NHis Sekvenču:

```
TAATACGACTCACTATAGGGAATGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATATCCATGTATCGATTAAATAAGGAGGAATAAACCATGAATCACCA
TCACCATCACCATCACCATTCGGTACCGAAACCTGTATTCAGTGAACCTTAATTAACTCGAGCGCATGGAGCCACCCCGCATGTCGAAATAAAGCTTGAGTATCTATAGTGTCACTAAAT
CCAGCTTGATCCGGCTGTAAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTGGCTGCTGCCACCCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAG
GAGGAACCTATATCCGGATAAATCGGGTAATAGCGAAGAGGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCACACAGTTGGCGAGCCTGAATGGCGAATGGAATTTGTAAGCGTTAATTTTTGTTAAATTCGGC
TAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTAT
TAAAGAACGTGGACTCAACGTCAAAGGGCGAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACAGCTTGCATGCTGCAGGTCGGAAGCATAAAGTGAAGCTGGGGTGGCTAATGAGTGAAGCTAA
CTTACATTAATTTGGCTTGGCTCACTGCCCGTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGATTAATGAATCGGCAACCGCGGGGAGAGCGGGTTGCGTATTGGGGCCAGGGTGGTTTTT
CTTTTCACAGTGAAGCGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCGCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCACGCTGGTTTGGCCAGCAGGCGGAAATCCTGTTGATGGTGGTTAACGGC
GGGATATAACATGAGCTGTCTCGGATCGTCTGATCCCACTACCGAGATATCCGCAACACCGCGAGCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTTGCCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACGAGC
ATCGCAGTGGGAACGATGCCCTATTCAGCAATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCAGTCGCCTTCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGC
CAGCCAGACGAGACGCGCCGAGACGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGGATTTGTGGTGAACCAATGCGACAGATGCTCCAGCCAGTCCGCTTCCATGGGAGAAAATAATA
CTGTTGATGGGTGCTGGTCAAGACATCAAGAAATAACCGCGGAACATTAGTGCAGGACAGCTCCACAGCAATGGCATCCTGGTATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCACTGACCGCTGGC
```

GCGAGAAGATTGTGCACGGCCGCTTACAGGCTTCGACGGCCGCTTCTGTTCTACCATCGACACCACCGCTGGCACCAGTTGATCGGCGGAGATTTAATCGCCGGA CAATTTGCGACGGCCG
 TGCACGGCCAGACTGGAGGTGGCAAGCCCAATCAGCAACGACTTTTGGCCGCGCTGTTGTGCGCACCGCGCTCCACATTTTCGGCGTTTTCG
 CAGAAACGGTGGCTGGCTGGTTCAACACGGGGAAACGGTGTGATAANGAGACCCGGCACTCTGCGACATCGTATAACGGTAACTGGTTTACATTCACACCCTGAATGGACTCTTTCGGGC
 GCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTTGCACCATTCTGATGGTGGCGGAGCTCGAATTTGAAACCATCAACCTAATCAAGTTTTTTGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAAACCTTA
 AAGGGAGCCCCGATTTAAGACTTACGGGGAAAGCCGGCAACCTGGCGGAAAGGAAGGGAAAGCAAGGGAGCGGGCGCTAGGGCCGTGGCAAGTGTAGCGGTACCGCTACCGCGCTGAA
 CCACACACCCGCCGCTAATTCGCCGCTACAGGGCGCTCTGATGGGATTTTCTCCTACGGATCTGTGGGATTTTACACCCGCATATGGTGCACCTCTAGTACAATCTGCTTGTATGCCG
 CATAGTTAAGCCAGCCCGACCCGCCAACCCCGTGACGGCCCTGACGGGCTTGTCTCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCCGCTCCGGGAGCTGCATGTGCAGAGGTTTTCC
 ACCGTCATCACGAAACCGCGAGAGCAAGGGCCGCTGATACGCCATTTTTATAGTTAATGTATGATAATAATGGTTTCTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTCGGCGGAAAC
 CCTATTGTGTTTTTTTAAATACATCAAAATATGTATCCGCTATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTCAATAAATTTGAAAAAGGAAGATGAGTATTCAACATTTCCGTTCCGCTTAA
 TTCCTTTTTGGCGCATTTTGCCTCTGTTTTTGTCCACCGAAGACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGTGCACAGTGGGTTACATCGAATGGATCTCAACAGCGGTAA
 GATCCTTGAGAGTTTTTCGGCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACCGGGCAAGCAACTCGGTCGGCCATACACTAT
 TCTCAGAATGACTTGGTGTGACTACACAGTACAGAAAGCATTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTTGCAAGTGTCCATAAACCATGAGTGATAAACCATGCGCCAACTTACTTCTTG
 ACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCAACAATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTATGCTGGGAAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAACGACGAGCGTGACACCAC
 GATGCTGTAGCAATGGCAACACGCTTGGCCAACTTTAATCTGGCGAACTACTACTAGTCTCCCGCAACAATTAATAGACTGATGGAGCGGATAAAGTTGCGAGGACCACCTCTCGCCCTC
 GGCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCTGGTTCTCGGGTATCATTTGCAAGCACTGGGCGCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTATCTACACGACGGGG
 AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGTGGCTCACTGATTAAGCAATTTGGTAACTGTGACAGCAAGTTTACTCATATACTTTAGATTTGATTTAAAACCTTATTTTT
 AATTTAAAGGATCTACGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTTGAGTTTTCTGCTGACGCTCAGAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTTTGAGATCCTTT
 TTTTCTGGCGTAATCTGCTGGCAAAACAAAAAACCCCGTACCACGGCGGTTTTGTTGGCGGATCAAGAGCTACCACTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATACCA
 AATACTGTTCTTGTAGTGTAGCCGTAAGTGGCCACCCTTCAAGAATCTGTAGCACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGTGCCAGTGCCGATAAAGTCGTTCTTAC
 CGGTTGGACTCAAGAGCATAGTTACCGGATAAGGCGACGGCTGGGCTGAACGGGGGTTCTGGCAACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAGC
 FATGAGAAAGCCGACCTTCCGAAGGAGAAAGGCGGACGATTCGGTAAGCGGGCAGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGTCCACGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCC
 TGTCGGGTTTCCCACTTCTGAGCTGATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACCGCGCTTTTTACGGCTTTCGGCTTTTGGCTTTCGCTTTTGGCT
 ACATGTTCTTCTGCTTATCCCTGATTCTGGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGGCAACCGCAGCCGACGCGAGCTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAAG
 AGCGCCAATACGCAAAACCGCTTCCCGCGCGCTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGAT

pEXP-NHis plazmīdas karte:



4.4. Ģenētiski modificētais organisms

E. coli K-12 un *B* cilmes derivātu šūnas, kas satur ekspresijas vektorus ar dažādiem proteīnus kodējošiem insertiem.

- 1) ĢMO un tā metabolisma produktu toksiska vai alergiska iedarbība, izmainīta patogenitāte vai kolonizācijas spēja attiecībā uz cilvēku veselību
- 2) ĢMO iedarbība attiecībā uz vidi

- **Ekosistēma, kur ĢMO varētu nejauši izplatīties, tā dzīvotspēja, vairošanās un izplatības apjoms**

Ģenētiskajā modifikācijā plānots izmantot *E. coli* celmus, kas nespēj konkurēt ar dabā esošajiem mikroorganismiem. To nejaušas izplatības risks ir ļoti zems.

- **Paredzamais rezultāts, ja ĢMO nejauši izklūst ārpus ierobežojošajiem pasākumiem un mijiedarbojas ar citiem organismiem**

Ja organismi izklūst ārpus ierobežojošajiem pasākumiem ir maz ticams, ka saglabāsies tā dzīvotspēja.

- **Iespējamā kaitīgā ietekme uz augiem vai dzīvniekiem**

Ekspresēto gēnu produkti nevar atstāt kaitīgu ietekmi uz augiem vai dzīvniekiem.

- **Dalība bioģeokīmiskajos procesos**

Plānotā ģenētiskā modifikācija nemainīs modificēto baktēriju īpašības, kuras varētu ietekmēt to dalību bioģeokīmiskajos procesos nejaušas izkļuves gadījumā.

5. Ierobežotās izmantošanas darbību riska izvērtējums

5.1. Ģenētiski modificētā organisma un ar to saistīto citu ģenētisko materiālu iespējamās kaitīgās īpašības un to nozīmīgums attiecībā uz cilvēku un dzīvnieku veselību vai vidi

Veicot ģenētiskajā modifikācijā iesaistīto organismu un ar to saistīto citu ģenētisko materiālu riska izvērtēšanu atbilstoši normatīvajiem aktiem (MK noteikumi Nr. 784), netika konstatētas kaitīgās īpašības vai ietekmes, kas varētu apdraudēt cilvēku vai dzīvnieku veselību vai atstāt nelabvēlīgu ietekmi uz vidi.

5.2. Ierobežojošie un drošības pasākumi, kas atbilst pirmajai ierobežotās izmantošanas drošības klasei

1) Darbagaldu virsmām jābūt izturīgām pret ūdens, skābju, sārmu, šķīdinātāju, dezinfekcijas un attīrīšanas līdzekļu iedarbību un viegli tīrāmām.

2) Tiek nodrošināta darba virsmu sterilizācija, piemēram, izmantojot 70% etanola šķīduma aerosolu.

3) Darba gaitā radušies šķidrie bioloģiskie atkritumi tiks sterilizēti izmantojot ķīmisko sterilizāciju ar Virkon plaša spektra dezinfekcijas līdzekli (vismaz 1% šķīdums). Virkon dezinfekcijas līdzeklis satur kālija peroksimonosulfātu (oksidants), nātrija dodecilbezēnsulfātu (SDS – virsmaktīva viela), sulfamīnskābi (tīrīšanas līdzeklis), kā arī neorganiskus buferus. Virkon efektīvi sterilizē baktērijas, sēnītes un vīrusus. Tas ir iedarbīgs pre *E. coli* un iznīcina tajās esošo ģenētisko materiālu.⁶

4) Tiek nodrošināta visu darba piederumu sterilizācija, autoklavējot. Autoklāvs atrodas ēkā, kurā tiek veiktas ģenētiskā modifikācijas. Autoklavēšanai tiek izmantoti indikātori, kas parāda, ka nepieciešamā temperatūra tika sasniegta (I.tipa). Vismaz diviem laboratorijas darbiniekiem ir sniegta padziļināta apmācība darbā ar autoklāvu, par ko ir arī sniegta apliecība. Autoklāvi ir aprīkoti ar spiediena un temperatūras zondi, kas nodrošina, kas sterilizācija tiek veikta atbilstošā ilgumā.

5) Darbā ar ĢMO personāls nēsā aizsargapģērbus – halātu un cimds. Halāti tiek regulāri mazgāti atsevišķā tam paredzētā veļas mašīnā.

6) Tiek kontrolēta nevēlamu sugu iekļūšana ierobežotai izmantošanai paredzētajās telpās.

5.3. Izmantoto ĢMO koncentrācija un apjoms

Maksimālais paredzētais sausās biomasas apjoms viena eksperimenta ietvaros ir 100 grami. Maksimālais šķidrās kultūras tilpums ir 20 litri.

5.4. Mikroorganismu kultūras audzēšanas apstākļi

Mikroorganismu kultūru audzēšanā tiks veiktas standarta darbības – mikroorganismu audzēšana uz cietās barotnes Petri platēs un mikroorganismu pavairošana izmantojot šķidrās kultūras ar antibiotiku selekciju. Temperatūru diapazons: 15-37°C. Darba gaitā radušies šķidrie bioloģiskie atkritumi tiks sterilizēti izmantojot ķīmisko sterilizāciju ar Virkon plaša spektra dezinfekcijas līdzekli. Pēc ķīmiskās dezinfekcijas, šie šķidrumi ir klasificējami ka šķidrie ķīmiskie atkritumi, kas tiek utilizēti, izmantojot ārpakalpojumu.

6. Ierobežotās izmantošanas galīgā drošības klase un drošība pasākumi

Plānotajās ģenētiskajās modifikācijās iesaistītie ģenētiskie materiāli, kā arī galējie ģenētiski modificētie organismi nesatur kaitīgas vai iespējami kaitīgas īpašības, tādēļ aprakstītās ierobežotās izmantošanas darbības atbilst pirmajai drošības klasei.

Pirmajai drošības klasei atbilstošie drošības pasākumi:

- 1) Darbagaldu virsmām jābūt izturīgām pret ūdens, skābju, sārmu, šķīdinātāju, dezinfekcijas un attīrīšanas līdzekļu iedarbību un viegli tīrāmām.
- 2) Tiek nodrošināta darba virsmu sterilizācija, piemēram, izmantojot 70% etanola šķīduma aerosolu.
- 3) Darba gaitā radušies šķidrie bioloģiskie atkritumi tiks sterilizēti izmantojot ķīmisko sterilizāciju, piemēram, ar Virkon plaša spektra dezinfekcijas līdzekli (vismaz 1% šķīdums).
- 4) Tiek nodrošināta visu darba piederumu sterilizācija, autoklāvējot. Autoklāvs atrodas ēkā, kurā tiek veiktas ģenētiskā modifikācijas.
- 5) Darbā ar ĢMO personāls nēsā aizsargapģērbu – halātu un cimdus.
- 6) Tiek kontrolēta nevēlamu sugu iekļūšana ierobežotai izmantošanai paredzētajās telpās.

Izmantotā literatūra

- (1) *NIH GUIDELINES FOR RESEARCH INVOLVING RECOMBINANT OR SYNTHETIC NUCLEIC ACID MOLECULES*; National Institutes of Health: Bethesda, MD, 2019.
- (2) *COLONIZATION POTENTIALS OF MALE AND FEMALE E. COLI K-12 STRAINS E COLI B AND HUMAN FECAL E. COLI STRAINS IN THE MOUSE GI TRACT.*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, D.C., 1980.
- (3) *FINAL RISK ASSESSMENT OF ESCHERICHIA COLI K-12 DERIVATIVES*; United States Environmental Protection Agency: Washington, D.C., 1997.
- (4) O'Brien A D; Holmes R K. Shiga and Shiga-like Toxins. *Microbiol. Rev.* **1987**, 51 (2), 206–220. <https://doi.org/10.1128/mr.51.2.206-220.1987>.

- (5) LaVeck, G. *Exposure Assessments of Microorganisms Considered for 5(h)(4) Exemptions under the Proposed Biotech Rule.*; U.S. Environmental Protection Agency: U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- (6) Gasparini, R. et al. Evaluation of in Vitro Efficacy of the Disinfectant Virkon. *Eur. J. Epidemiol.* **1995**, *11* (2), 193–197. <https://doi.org/10.1007/BF01719487>.