ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ნათია გურეშიძე

ფრინველის გენმოდიფირებულ საკვებში, რეკომბინანტული დნმ-ის რაოდენობის განსაზღვრა და მისი დეგრადაციის ხარისხის შესწავლა ბროილერის საჭმლის მომნელებელ სისტემაში

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნირებათა ფაკულტეტი
ბიოლოგიის დეპარტამენტი
სამაგისტრო პროგრამა
გამოყენებითი ბიომეცნიერებები და ბიოტექნოლოგიები

ნაშრომი შესრულებულია: მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

თემის ხელმძღვანელი :

ასისტენტ პროფესორი ზურაბ ქუჩუკაშვილი

თბილისი
2017

სარჩევი

ანოტაცია 4
Annotation 6
შესავალი 7
1.ლიტერატურული მიმოხილვა..... 10
1.1გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი..... 10
1.2გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის შემზღუდავი ფაქტორები 12
1.3 გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერით გამოწვეული რისკები.....12
1.4 გმო-გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის პოტენციური დონორი 13
1.5 დნმ-ს დეგრადაცია საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში 14
1.6 გენმოდიფიცირებული სოიო 15
1.7 გენმოდიფიცირების მეთოდები 17
1.8 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (PCR) 19
2. მეთოდები 23
2.1 ცდის ობიექტი..... 23
2.2. დნმ-ს ექსტრაქცია..... 23
2.2.1დნმ-ს ექსტრაქცია Bio-Rad-ს კიტის მიხედვით 24
2.2.2 დნმ-ს ექსტრაქცია SUREFOOD PREP BASIC კიტის მიხედვით..... 25
2.3 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია 27

2.4 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტების ელექტროფორეზი..... 29

2.5 პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში 30

2.6 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (პჯრ - რეალურ დროში) გენმოდიფიცირებული სოიოს რაოდენობრივი ანალიზი.....32

2.7 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (პჯრ - რეალურ დროში) მცენარეული გენომის განმსაზღვრელი ანალიზი.....35

3.შედეგები და განხილვა 37

3.1 ცხოველთა საკვები დანამატიდან ექსტრაგირებული დნმ-ს პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტების ელექტროფორეზი 38

3.2 საცდელი და საკონტროლო ჯგუფის ექსკრემენტების კვლევის შედეგი P35'S , T'NOS და PSII-ის შემცველობაზე 35

3.3 InstaGene'' ხელატორული მიკრო ნაწილაკებით ექსტრაგირებული დნმ-ის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია..... 44

3.4 InstaGene'' ხელატორული მიკრო ნაწილაკებით ღვიძლიდან ექსტრაგირებული დნმ-ის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია.....47

3.5 ,,Spin Column'' მინი სვეტებით ექსტრაგირებული დნმ-ის პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია 50

3.6 მცენარეული და ცხოველური დნმ-ის პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია.....52

3.7 ფრინველის საკვების გმო რაოდენობრივი ანალიზი - პჯრ რეალურ დროში.....54

დასკვნა..... 58

გამოყენებული ლიტერატურა.....59

ანოტაცია

გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმი (გმო) ისეთი ორგანიზმია, რომლის გენეტიკური მასალა შეცვლილ იქნა გენეტიკური ინჟინერიის მეთოდების გამოყენებით. გმ ორგანიზმები გამოიყენება როგორც ბიოლოგიურ და სამედიცინო კვლევაში, ისე ფარმაკოლოგიურ წარმოებასა და აგრობიზნესში. დღესდღეობით გმ ორგანიზმებს ბევრი წამყვანი ქვეყანა აწარმოებს. გმო მარცვლეულის წარმოებელ ქვეყნებს მიეკუთვნებიან: აშშ, ბრაზილია, კანადა, ინდოეთი, ჩინეთი. გმო ორგანიზმები ფართოდ გამოიყენება საკვების სახით, როგორც ადამიანებში ასევე ცხოველებში. საკვების შემადგენელი დნმ-ს დეგრადაციის პროცესისადმი ინტერესი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების ფართოდ გავრცელების შემდეგ გაიზარდა. ვინაიდან, მწირია ექსპერიმენტული მონაცემები საჭმლის მომნელებელ სისტემაში დნმ-ს დეგრადაციასთან დაკავშირებით, არ არის ერთმნიშვნელოვნად გარკვეული ცხოველის გენმოდიფიცირებული ნედლეულით გამოკვების შემთხვევაში, რა დონემდე დეგრადირდება რეკომბინანტული დნმ. ჩვენ მიერ, პირველად შესწავლილი იქნა საქართველოში ფართოდ მოხმარებადი ფრინველის გენმოდიფიცირებული საკვების გამოყენების შემდეგ, ხდება თუ არა რეკომბინანტული დნმ-ის დეგრადაცია ქათმის საჭმლის მომნელებელ სისტემაში, და ასევე მიმდინარეობს თუ არა გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი ისეთ პოტენციურ სუბპროდუქტებში, როგორიცაა: კუჭი, ღვიძლი და კუნთი. კვლევები ჩავატარეთ ორ სერიად ორი წლის განმავლობაში. საკვლევ ობიექტს წარმოადგენდა ბროილერის ჯიშის წიწილები, რომელთა დაყოფაც მოვახდინეთ ორ ჯგუფად: საკონტროლო და საცდელი ჯგუდი. მას შემდეგ რაც საკვლევმა ობიექტებმა მიაღწიეს სარეალიზაციო მოცულობას, მათგან მოვახდინეთ შეგროვება ექსკრემენტებისა და ისეთი პოტენციური სუბროდუქტების, როგორიცაა კუჭი, ღვიძლი და კუნთი. აღნიშნული პროდუქტები წარმოადგენს ფართო მოხმარების სურსათს.

გმო-ს დეტექციისთვის გამოვიყენეთ პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის მეთოდი. ნიმუშების ანალიზი მოვახდინეთ Eurofin-ის მიერ წარმოებული Roundup Ready™ Soybean PCR kit-ის მეშვეობით.

გამოკვლეული ნიმუშებიდან არც ერთ საკონტროლო ჯგუფში არ დაფიქსირდა Roundup Ready Sooybean-ის გენსპეციფიკური მარკერის არსებობა, ხოლო საცდელი ჯგუფის 5 კუჭსა და 7 კუნთში დაფიქსირდა Roundup Ready Soybean-ის გენსპეციფიკური თანმიმდევრობის ჰორიზონტალური ტრანსფერი.

Annotation

A genetically Modified organism (GMO) is any organism whose genetic material has been altered using genetic engineering techniques. GMOs are used in biological and medical researches, production of pharmaceutical drugs and in agriculture. Nowadays, GMO is produced in many developed countries, such as: USA, Brazil, Canada, China, India and etc… GMO is widely used as human's food and animal's feed. The interest in degradation of food's DNA has been increased for several years. There is a lack of experimental studies about food's DNA degradation in the gastrointestinal track. It is not obvious, how completely recombinant DNA is degraded after feeding animals with GM products. In Georgia, we are the first, who examined whether recombinant DNA is completely degraded in hen's gastrointestinal tract or not, also whether horizontal gene transfer takes place from intestinal track into byproducts, such as : stomach, liver and muscle or not. Research was conducted during two years. We have chosen Broiler's hens which we divided into two groups: the control ones and experimental ones. After broiler's hens had reached the commercial size, we collected excreta and potential byproducts, such as stomach, liver and muscles from them. These byproducts are commonly used as popular food on supermarkets.

Polymarase chain reaction was used to detect our samples. The analyses were conducted by Eurofin Roundup Ready™ Soybean PCR kit.

We have found no gene specific markers for the control group, but in the experimental group we found 5 stomach and 7 muscles with Roundup Ready Soybean gene specific markers.

შესავალი

როგორც საქართველოს კანონმდებლობა განმარტავს, გენმოდიფიცირებული ორგანიზმი – ნებისმიერი ორგანიზმი (ადამიანის გარდა), რომლის გენეტიკური მასალა შეცვლილია არაბუნებრივი (თანამედროვე ბიოტექნოლოგიური) მეთოდების გამოყენებით, რაც ნიშნავს ორგანიზმის გენეტიკური მასალის შეცვლას ხელოვნურ (ინვიტრო) 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; ამავედროს, ისინი არ განეკუთვნება ტრადიციულ სელექციურ და ჯიშთა გამოყვანის მეთოდებს [1]. გენმოდიფიცირებული ორგანიზმები (გმო) გამოიყენება როგორც ბიოლოგიურ და სამედიცინო კვლევაში, ისე ფარმაკოლოგიურ წარმოებასა და აგრობიზნესში. დღესდღეობით გმ ორგანიზმებს ბევრი წამყვანი ქვეყანა აწარმოებს. გმო მარცვლეულის წარმოებელ ქვეყნებს მიეკუთვნებიან: აშშ, ბრაზილია, კანადა, ინდოეთი, ჩინეთი და სხვა [2]. გმო ორგანიზმები ფართოდ გამოიყენება საკვების სახით,როგორც ადამიანებში ასევე ცხოველებში. საქართველოში შემოტანილი ცხოველის საკვების, განსაკუთრებით კი სხვადასხვა დანამატებით გამდიდრებული ფრინველის საკვები - ეგრეთწოდებული პრემიქსის, 90%-ზე მეტი იმპორტირებულია იმ ქვეყნებიდან, რომლებიც აწარმოებენ გმო-ს და შესაბამისად შეიძლება ითქვას რომ ქართული ბაზარი გაჯერებულია გმო ფრინველის საკვებით. ამასავე ადასტურებს ჩვენ მიერ ჩატარებული ადრეული კვლევებიც [3]. რაც შეეხება საქართველოს კანონმდებლობას-საქართველოს ტერიტორიაზე აკრძალულია გენმოდიფიცირებული ორგანიზმის გარემოში ინტროდუქცია. აღნიშნული მოთხოვნის დარღვევა იწვევს პასუხისმგებლობას საქართველოს კანონმდებლობით დადგენილი წესით [1]. ამავე დროს საგულისხმოა ის ფაქტი, რომ აღნიშნული კანონმდებლობა არანაირად არ არეგულირებს ცხოველის გმო საკვების გადამუშავების შედგომ არსებული ნარჩენების მართვას. შესაბამისად, ამ ნარჩენების უკონტროლო გაბნევა გარემოში წარმოადგენს პოტენციურ

საფრთხეს გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერისა. საკვების შემადგენელი დნმ-ს დეგრადაციის პროცესისადმი ინტერესი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების ფართოდ გავრცელების შემდეგ გაიზარდა. ვინაიდან, მწირია ექსპერიმენტული მონაცემები საჭმლის მომნელებელ სისტემაში დნმ-ს დეგრადაციასთან დაკავშირებით, არ არის ერთმნიშვნელოვნად გარკვეული ცხოველის გენმოდიფიცირებული ნედლეულით გამოკვების შემთხვევაში, რა დონემდე დეგრადირდება რეკომბინანტული დნმ. ცხოველის სახეობაზე დამოკიდებულებით განსხვავებულია დნმ-ის დეგრადაციის ხარისხი, რაც დამოკიდებულია საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის სიგრძეზე, ტრაქტში დაყოვნების ხანგრძლივობასა დაჰიდროლიზის პირობებზე [4]. მეცნიერთა მოსაზრებები გმო პროდუქციის უვნებლობასთან დაკავშირებით არაერთგვაროვანია, რაც გამოწვეული რიგი ფაქოტრებით, რომელთაგანაც აღსანიშნავია გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი არის გენეტიკური მასალის სტაბილური გადატანა ერთი ორგანიზმიდან მეორეში რეპროდუქციის გარეშე. გენმოდიფიცირებული ორგანიზმები განიხილებიან გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის პოტენციურ დონორებად, რაც დაკავშირებულია იმ ფაქტთან რომ ისინი შეიცავენ რეკომბინანტული დნმ-ს, რომელშიც აქტიურია, უცხო გენეტიკური თანმიმდევრობა, და მას შენარჩუნებული აქვს აქტიური რეგულატორული თანმიმდევრობა, როგორიცაა პრომოტორ - ტერმინატორი, რის გამოც ასეთი პროდუქტი არის პოტენციური დონორი გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერისა. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის მეშვეობით შეიძინა მრავალმა ბაქტერიამ ანტიბიოტიკრეზისტენტობის თვისება [5-8]. ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, დავინტერესდით შეგვესწავლა რეკომბინანტული დნმ- ის დეგრადაცია ქათმის საჭმლის მომნელებელ სისტემაში და ასევე ხდება თუ არა გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი სუბპროდუქტებში, როგორიცაა კუჭი, ღვიძლი და კუნთი, რომლებიც სასურსათო ბაზარზე განეკუთვნება სარეალიზაციო პროდუქტებს. ქათმის საჭმლის მომნელებელი სისტემის სპეციფიკიდან გამომდინარე, დნმ თავდაპირველად განიცდის კუჭში მჟავურ ჰიდროლიზს, წვრილ ნაწლავში გადასვლის შემდეგ კი განიცდის ფერმენტული ჰიდროლიზის პროცესს, ნუკლეაზების ზემოქმედებით. ლიტერატურული მონაცემებით ცნობილია არაერთი ფაქტი ცხოველის გმო-თი გამოკვებისას გენების გადასვლისა სხვადასხვა ორგანოებში. წინა წლებში

ჩატარებული ცდები ცხადჰყოფენ, რომ ვირთაგვებში ადგილი აქვს დნმ-ის გადასვლას საჭმლის მომნელებელი ტრაქტიტან სისხლში, ღვიძლსა და ელენთაში [9]. აქედან გამომდინარე საინტერესოა შევისწავლოთ, თუ როგორ მიმდინარეობს რეკომბინანტული დნმ-ის დეგრადაცია ქათმის საჭმლის მომნელებელ სისტებაში, არის თუ არა ეს დეგრადაცია სრული და ასევე ხდება და თუ არა რეკომბინანტული დნმ კონსტრუქციის მთლიანი ან ნაწილობრივი (აქტიური კომპონენტები- პრომოტორ-ტერმინატორი) სახით გადასვლა საჭმლის მომნელებელი სისტემიდან ორგანოებში.

1.ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი

გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი არის გენეტიკური მასალის სტაბილური გადატანა ერთი ორგანიზმიდან მეორეში რეპროდუქციის გარეშე. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი დიდ როლს თამაშობს ზოგადად ევოლუციის პროცესში. უნდა აღინიშნოს , რომ გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის მეშვეობით განხორციელდა ანტიბიოტიკ რეზისტენტული ბაქტერიების ფორმირება[10].გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი შესაძლებია მოხდეს ისეთი მობილური გენეტიკური ელემენტების არსებობის შემთხვევაში, როგორიცაა პლაზმიდები (ექსტრაქრომოსომული გენეტიკური მატერია) , ტრანსპოზონები (მხტუნავი გენები) ბაქტერიის ვირუსები (ბაქტერიოფაგები) ამ ელემენტების გადასვლა ორგანიზმებს შორის მიმდინარეობს სხვადასხვა მექანიზმით, რაც პროკარიოტების შემთხვევაში მოიცავს ტრანსფორმაციას, კონიუგაციასა და ტრანსდუქციას. ტრანსფორმაცია ხორციელდება პროკარიოტების მიერ დნმ-ის თავისუფალი ნაწილების ათვირებით, რაც ძირითადად წარმოდგენია პლაზმიდების სახით. კონიგაციისას გენეტიკური მასალაის გაცვლა ხდება ორ უჯრედს შორის დროებითი კავშირის წარმოქნისას. ტრანსდუქცია კი ხორციელდება მემკვიდრული მასალის უჯრედში შეტანით ბაქტერიოფაგების მიერ.

გენტა ჰოროზინტალური ტრანსფერისას , ახალი დნმ-ის ათვისება გენომში მიმდინარებს ან რეკომბინაციის ან ინსერციის გზით. რეკომბინაცია ეს არის ისეთი გენების დაჯგუფება, სადაც ახალი და ნატიური დნმ-ის სეგმენტები არიან ჰომოლოგიურები. ინსერცია გულისხმობს დნმ-ის ისეთ ჩართვას უჯრედის გენომში, მაშინ როცა მათ შორის არ არსებობს არანაირი ჰომოლოგიურობა.

გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის მოვლენა პირვლად აღმოჩინიეს 1928 წელს, როდესაც ფრედ გრიფიტმა, ცდის საფუძველზე აჩვენა, რომ გაცხელებით დახოცილი ვირულენტური *Streptococcus pneumoniae*-დან განხორციელდა გენეტიკური მასალის გადასვლა არავირულენტურ შტამებში და შედეგად მათ ვირულენტობის თვისება შეიძინეს. ეს პროცესი აღწერილ იქნა, როგორც ტრანსფორმაცია. 1946 წლიდან კიდევ დაიწყეს გენთა არა

ვერტიკალური, ანუ არა შთამომავლობითი გადაცემის მოვლენების დაფიქსირება და მათ შესაბამისად ეწოდა: ტრანსდუქცია, ტრანსფომრაცია, კონიუგაცია. მხოლოდ 1980 წლებიდან ყველა მათგანს ზოგადად გენთა ჰორიზონტალური, ან ლატერალური ტრანსფერი ეწოდა.

გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის განხორციელებისათვის აუცილებელი არ არის ორგანიზმთა ფილოგენეტიკური ნათესაობა . ის შესაძლოა განხორციელდეს ვირუსს და ცხოველთა უჯრედებს შორის.

არსებობს გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის ორი სახეობა :1)პირდაპირი ჰორიზონტალური ტრანსფერი და 2) არაპირდაპირი ჰორიზონტალური ტრანსფერი.

გენთა არაპირდაპირი ჰორიზონტალური ტრანსფერის შემთხვევაში დონორიდან გენეტიკური მასალის რეციპიენტამდე მიწოდება უშუალოდ არ ხდება , არამედ მონაწილეობას იღებს მესამე რგოლი, ყველაზე ხშირად გავრცელებულია ვირუსის მედიატორობით განხორციელებული არაპირდაპირი გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი.

მთავარი მექანიზმი გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერისა, რომელიც ყველაზე ხშირადაა აღწერილი ლიტერატურაში, მოიცავს შემდეგს : ვირუსით გაშუამავლებულ ტრანსდუქციას, კონიუგაციასა და უჯრედულ კომპეტენციას, რომელსაც ეწოდება ნატურალური ტრანსფორმაცია.

გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი , თავის მხრივ, მოიცავს ორ ძირითად ფაზას, მექანიკურ-ფიზიკური ურთიერთქმედების და ქიმიურ-ბიოქიმიურ ურთიერთქმდების ფაზას. თავდაპირველად ხდება დონორი ორგანიზმიდან გენეტიკური მატერიის გამოსვლა და შემდეგ მისი შესვლა რეციპიენტის უჯრედში. უჯრედში შეღწევის შემდეგ აღნიშნული გენეტიკური მატერიის ჩართვაა აუცილებელი აქცეპტორის გენომში. გენომში ჩართული უცხო გენეტიკური თანმიმდევრობა ცვლის მასპინძელი ორგანიზმის გენთა ექსპრესიის

უნარს, და აგრეთვე შესაძლოა საკუთრივ, თვითონ უცხო გენეტიკური თანმიმდევრობის ექსპრესიაც განხორციელდეს[11,12]

1.2გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის შემზღუდავი ფაქტორები

გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ევოლუციის პროცესში და ამდენად იგი საციცხოცხლო მნიშვნელობის გავლენას ახდენს ცოცხალ ორგანიზმებზე, თუმცა , ამავე დროს უნდა აღინიშნოს ,რომ გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერით აქცეპტორში შესული გენეტიკური თანმიმდევრობა წარმოადგენს ზედმეტ ტვირთს ორგანიზმისათვის და ამასთანავე არსებობს ძლიერი ფიზიკური ბარიერები უცხო გენეტიკური მასალის გენომში ჩართვისთვის . გარადა ამისა , მრავალუჯრედიან უმაღლეს ორგანიზმებში სასქესო უჯრედები დაცულნი არიან უცხო გენეტიკურ მასალასათან , ბაქტერიასა და ვირუსთან უშუალო კონტაქტისაგან.

1.3 გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერით გამოწვეული რისკები

გენეტიკური მოდიფიცირებამ შესაძლოა ჰპოვოს მრავალი გამოყენება სოფლის მეურნეობაობას, ფარმაციასა და ინდუსტრიული ქიმიურ წარმოებებში. მიუხედავად ბევრი დადებითი შესაძლობლობებისა, ამ პროცესებმა განვლეს დიდი განხილვები და რეგულაციები. რისკის შეფასება წარმოადგენს რეგულაციის ერთ-ერთ სახეობას, რომელიც განსაზღვრავს გმოს გამოყენების შედეგად მიღებულ კომერციულ სარგებელს და ასევე მის გავლენას გარემოზე. რისკის შეფასებისას კრიტიკულ წერტილს წარმოდგენს ის შესაძლო გვერდითი ეფექტები რისი გამოწვევაც შეუძლია გმო ორგანიზმების ფართო და არაკონტროლირებად გამოყენებას. ჰორიზონტალური ტრანსფერი გმო ორგანიზმებიდან სხვა ორგანიზმებში წარმოადგენს ერთ-ერთ მნიშვნელოვან პოტენციურ რისკს. გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული და ხშირი ბუნებრივი მოვლენაა გარემოსათვის. ყველა ორგანიზმს გააჩნია წარსული ისტორია გენთა

ჰორიზონტალური ტრანსფერის და ეს ეხება ყველა გენს, მათ შორის გენურ ტექნოლოგიაში წარმოდგენილს. ტრანსფერულმა გენმა შესაძლოა მოახდინოს სამი სახის ეფექტი ორგანიზმში, ნეგატიური, ნეიტრალური და პოზიტიური. ამის მაგალითია, ბიორემედიაცია დაბინძურებული გრუნტის წყლების, რომლის გაზრდაც შესაძლებელია ბაქტერიის გენმოდიფიცირების შედეგედად.

1.4 გმო - გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის პოტენციური დონორი

შესაძლებლობა გენმოდიფიცირებული ორგანიზმიდან გენეტიკური მასალის გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის მეშვეობით გადასვლისა სხვა სახეობებში , განიხილება როგორც საფრთხე .

საბოლოო ჯამში , ის უარყოფითი შედეგები რაც შეიძლება გენმოდიფიცირებული ორგანიზმებიდან გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის შემთხვევაში ადამინსა და გარემოს მიადგეს არის შემდეგი :

- უარყოფითი გავლენა ადამიანის ჯანმრთელობაზე და ასევე გარემოზე. გენმოდიფიცირების მარკერებად გამოიყენება ანტიბიოტიკ რეზისტენტობის გენები, შესაბამისად გენმოდიფიცირებული ორგანიზმი არის მატარებელი აღნიშნული ფუნქციის მატარებელი გენისა, გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის შემთხვევაში თუ ანტიბიოტიკ რეზისტენტობის გენი გადავიდა ბაქტერიაში, მაშინ ის უკვე გახდება რეზისტენტული და მასთან ბრძოლის ახალი მეთოდების დანერგვა იქნება საჭირო.
- არაპროგნოზირებადი და არაშერბილებადი შედეგები : გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი შესაძლოა განხორციელდეს გმო-დან უამრავ სახეობაში, შესაბამისად შესალოა ზოგი არა პათოგენური მიკროორგანიზმი პათოგენურად ჩამოყალიბდეს და აგრეთვე შესაძლოა, ზოგადად ეკოლოგიური ბალანსი დაირღვეს, ვინაიდან,

არსებობს შესაძლებლობა უცხო გენეტიკური თანმიმდევრობის ექსპრესიის შემდეგ ორგანიზმის სტრუქტურულ - ფუნქციონალური ცვალებადობებისა.

- გენომის "დანგრევა" : ეუკარიოტული უჯრედები მეტად არიან ინტოლერანტულები ვიდრე მარტივი ორგანიზმები და გენომური ტექნოლოგიების გამოყენების შემთხვევაში მათი გენომი ხდება არასტაბილური და იზრდება ალბათობა გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერისა.
- ეფექტები რომლის რეალიზებაც დიდი დროის შემდეგ ხდება - ზოგ შემთხვევაში უარყოფითი შედეგები შესაძლოა უფრო მკაცრი აღმოჩდეს დროთა განმავლობაში,მას შემდეგ რაც გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერი მოიცავს ათასობით თაობას და შესაძლოა სწორედ ეს ახალი ორგანიზმები გახდნენ გარემოსათვის დომინანტურები. დამატებითი ფაქტორები, რომლებიც შეიძლება იყოს როგორც აბიოტური ასევე ბიოტური იცვლება დროსთან ერთად და ამ ცვლილებებმა შესაძლოა გამოიწვიოს ის უარყოფითი მხარეები, რაც დღისათვის არ არის თვალსაჩინო. (Pääbo et al., 2004)

1.5 დნმ-ს დეგრადაცია საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში

დნმ-ს დეგრადაციის შესწავლამ საჭმლის მომნელებელ სისტემაში, ახალი ინტერესი მას შემდეგ მოიპოვა, რაც გენეტიკურად მოდიფიცირებული ორგანიზმების გამოყენება კომერციულად ფართოდ დაიწყეს. გენეტიკურად მოდიდიფიცირებული ორგანიზმები წარმოადგენენ გენთა ჰორიზონტალური ტრანსფერის პოტენციურ დონორებს . გენეტიკური მასალა შესაძლოა გდავიდეს, როგორც ცხოველთა უჯრედში, ასევე არსებობს საშიშროება მისი გადასვლისა საჭმლის მომნელებლ სისტემაში არსებულ მიკროორგანიზმებში და ასევე გარემოში მცხოვრებ მიკროორგანიზმებში, იმ შემთხვევაში თუ არ მოხდება დნმ-ს დეგრადაცია სრულად. ექსპერიმენტული კველევები აჩვენებს, რომ დნმ-ს გარეკვეული რაოდენობა არ განიცდის დეგრადაციას საჭმლის მომნელებელ სისტემაში. ეს განსაკუთრებით ფრინველების საჭმლის მომნელებელ სისტემას ეხება , რომელთა საჭმლის მომნელებელის ტრაქტის სიგრძე მნიშვნელოვნად ნაკლებია ძუძუმწოვართა საჭმლის მომნელებლ ტრაქტთან [13].

საკვებში შემავალი დნმ გავლენას ახდენს ცხოველებზე რამდენიმე განსხვავებული გზით :

1) პირდაპირი ზემოქმედება, როგორც ნუტრიენტმა და შესაძლო ადსორბენტმა , საჭმლის მომნელებელი სისტემის ტრაქტზე

2) არაპირდაპირი ზემოქმედება , როგროც საკვებმა წყარომ საჭმლის მომნელებელი სიტემის მიკროფლორისათვის

დნმ-ს დეგრადაციაზე მოქმედებს საჭმლის მომნელებელი სიტემის აქტიური რეაქცია და აგრეთვე საჭმლის მომნელებელი წვენების ფერმენტები - ნუკლეაზები[14].

1.6 გენმოდიფიცირებული სოიო

1994 წელს მონსანტოს მიერ შტატების მარკეტში პირველად გამოჩნდა გენეტიკურად მოდიფიცირებული სოიო. იგი იყო გლიფოსატ ტოლერანტული. 2014 წლის მონაცემებით , მსოფლიო მასშტაბით სულ 90.7 მილიონ ჰექტარზე იყო გენმოდიფიცირებული სოიო კულტივირებული. რაც წარმოადგენს 82%-ს საერთოდ კულტივირებული სოიოსი.

Roundup Ready Soybeans არის ვარიაცია გენეტიკურად მოდიფიცირებული სოიოსი, რომელიც იქნა მიღებული მონსანტოს მიერ.

გლიფოსატი წარმოადგენს ჰერბიციდს, რომელიც აქტიურად გამოიყენებოდა სარეველების წინააღმდეგ . გლიფოსატი არღვევს შეუცვლელი ამინომჟავების სინთეზს. 5-ენოლპირუვილ შიქიმატ 3-ფოსფატ სინთაზა არის ფერმენტი, რომელიც დაკავშირებულია ნახშირბადის რედუქციასთან და შედეგად არომატული მჟავების წარმოქმნასთან. აღნიშნული ფერმენტის მოქმედების შედეგად უჯრედში ფორმირდება შემდეგი არომატული ამინომჟავები: თირროზინი, ფენილალანინი, ტრიფტოფანი და სხვა მეორადი მეტაბოლიტები. არომატული ამინომჟავების სინთეზი მცენარისათვის არსებითია , ვინაიდან ისინი მონაწილეობენ მცენარეული ჰორმონების ფორმირების პროცესში, უჯრედის მემბრანაში ლოკალიზებული ცილის შენებაში , ენერგიის ტრანსდუქციაში ჩართული ნივთიერებების სინთეზში,

როგორიცაა პლასტოქინონი. აგრეთვე პათოგენებისაგან თავდაცვაში. 5-ენოლპირუვილ შიქიმატ 3-ფოსფატ სინთაზა არის სპეციფიკური სამიზნე ჰერბიციდ გლიფოსატისათვის, აღნიშნული ჰერბიციდის მოქმედებით ხდება ფერმენტის კონფორმაციული ცვლილებები, რაც ხელს უშლის ფოსფოენოლპირუვატს ფერმენტთან დაკავშირებაში. ხდება ფერმენტის ინჰიბირება გლიფოსატის მიერ, რის შედეგადაც, უჯრედში არომატული ამინომჟავები აღარ სინთეზირდება და ადგილი აქვს შიქიმის მჟავის დიდი კონცენტრაციით დაგროვებას.

გლიფოსატ რეზისტენტობის მისაღწევად გამოიყენება შემდეგი მიდგომა: ტრანფორმაცია ხორცილედება ენოლპირუვილ შიქიმატ ფოსფატ სინთაზა-ს მუტანტი გენით, რომლის მიერ დასინთეზირებულ ფერმენტს არ გააჩნია გლიფოსატის შეცნობის საიტი/ დაბალი აფინურობით ხასიათდება ჰერბიციდისადმი. მუტანტი გენი aroA იზოლირებულია Salmonella typhimurium -დან. აღნიშნული გენით ტრანსფორმაცია მოხდა თამბაქოსა და პომიდვრის ბირთვული გენომისა. აღნიშნულ ტრანსგენულ მცენარეებს არ ჰქონდათ აგრონომიული მნიშვნელობა , ვინაიდან გენის თაობებში კარგვა ხდებოდა.

პირველი წარმატება გლიფოსატ ტოლერანტული მცენარის მისაღებად განპირობებული იყო პეტუნიიდან გამოყოფილი მუტანტური ენოლპირუვილ შიქიმატ ფოსფატ სინთაზა -ს გენის გამოყენებით, ეს მუტანტი ფორმა პეტუნიისა მიღებული იყო ინდუცირებული მუტაციით, აღნიშნული ჰერბიციდის ხანგრძლივი გამოყენების შედეგად. მოგვიანებით მუტანტი ESPS გენი მიღებულ იქნა Agrobacterium sp. Strain CP4-დან , აღნიშნული გენის მიერ დასინთეზირებული მუტანტური ფერმენტი საუკეთესო აღმოჩნდა გლიფოსტის რეზისტენტობისათვის. აღნიშნული გენი გამოყენებულ იქნა სოიოს ტრანსფორიმირებისათვის.

გლიფოსატ ტოლერანტობის ინჟინირებისათვის გამოიყენება აგრეთვე ორმაგი მუტანტი ESPS გენისა, რომელიც მიღებულია Salmonella typhimurium და Escherichia coli-დან. მიღებული გენები, რომლებიც შემთხვევითი მუტაციის შედეგია, რეკომბინირებულ იქნა. ტოლერანტობა განპირობებულ იყო, იმით რომ აფინურობა გლიფოსატისა , მუტანტი გენის მიერ დასინთეზირებულ ცილის მიმართ შემცირდა მნიშვნელოვნად.

გლიფოსატ რეზისტენტობის ინჟინირებისათვის შემდეგი ძირითადი მიდგომები გამოიყენება:

- ჰერბიციდ ინსენსიტიური ფერმენტის მაკოდირებელი გენების ტრანსგენეზი.
- ჰერბიციდის დეტოქსიკაციაში ჩართული ფერმენტის მაკოდირებელი გენის ტრანსგენეზი.
- ჰერბიციდის შეზღუდული ტრანსლოკაციის უზრუნველყოფა.
- მცენარეში იმ ფერმენტის, გენის აქტიური ექსპრესიის უზრუნველყოფა,რომელიც ჰერბიციდით ინაქტივირდება

1.7 გენმოდიფიცირების მეთოდები

მცენარეთა გენმოდიფიცირების მეთოდებიდან, სოიოსათვის ერთ-ერთი ყველაზე ხშირად გამოყენებულია ტრანსფორმაცია Agrobacterium Tumefaciens-ის მეშვეობით. მეთოდი დაფუძნებულია Ti-პლაზმიდების ბუნებრივ უნარზე მოახდინოს მცენარეთა გენეტიკური ტრანსფორმაცია. T დნმ-ში ხდება სასურველი თანმიმდევრობის ჩაშენებეა, შემდგომ კი Ti-პლაზმიდების და A. Tumefaciens-ის გამოყენებით ხდება მისი ჩამაგრება საკვლევი მცენარის გენომში. Ti-პლაზმიდების საფუძველზე ყველა ვექტორი მსგავსადაა ორგანიზებული და გაჩნია შემდეგი ელემენტები:

- ინტროდუცირებული გენი - აკოდირებს ახალი ტიპის ცილას. ეს გენი შეიძლება იყოს ბუნებრივი (ცოცხალი ორგანიზმიდან) ან ხელოვნური (in vitro) გზით მიღებული.
- პრომოტორული თანმიმდევრობა-გამოიყენება სასტარტო სიგნალი გენის ექსპრესიის ჩასართავად და ცილის დასასინთეზირებლად. მრავალ ნებადართულ გმო მცენარეში

გამოიყენება 35S პრომოტორი, რომელიც მიიღება ყვავილოვანი კომბოტოს მოზაიკური ვირუსიდან (CaMV)

- ტერმინატორული თანმიმდევრობა - იგივე შემაჩერებელი სიგნალი. ყველაზე ხშირად გამოიყენებენ Agrobacterium Tumefaciens-ის ნოპალინის მასინთეზირებელი გენიდან გამოყოფილ ტერმინატორს NOS ან TNOS

- მარკერული გენი - მაგალითად ნეომიცინფოსფატტრანსფერაზას გენი რომელიც უზრუნველყოფს ტრანსფორმირებული მცენარის უჯრედის მდგრადობას კანამიცინისადმი. მისი მეშვეობით ადგენენ სწორად მოხდა თუ არა სასურველი გენის ჩაშენება.

ტრანსფორმაციისათვის სოიოს მოუმწიფებელ ჩანასახს რამდენიმე წუთით ათავსებენ A. Tumefaciens-ის უჯრედების სუსპენზიაში. შემდგომ ხდება მისი ინკუბირება რამდენიმე დღით სელექტიური ზეწოლის გარეშე, რის შემდეგაც ჩანასახი გადააქვთ ანტიბიოტიკებიან არეში, სადაც ზრდა მხოლოდ ტრანსფორმირებულ მცენარეულ უჯრედებს შეუძლიათ. რამდენიმე დღე სიბნელეში ინკუბირების შემდეგ, გენმოდიფიცირებული სოიოს უჯრედები გადააქვთ სხვა საკვებ არეში და ხდება მათი ინკუბირება სინათლეზე ტრანსგენული მცენარის მთლიანი რეგენერაციისათვის. არსებობს მცენარეთა ტრანსფორმაციის სხვა მეთოდებიც: მიკრონაწილაკებით ბომბადირება, მიკროინექცია, ელექტროფორაცია, ტრანსფექცია და სხვა[13].

1.8 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) მეთოდი დაფუძნებულია დნმ-ს კონკრეტული უბნის მრავალჯერად კოპირებაზე ფერმენტ პოლიმერაზას საშუალებით. ამ შემთხვევაში კოპირება ხდება დნმ-ს კონკრეტული, წინასწარ შერჩეული უბნიდან, საკვლევ ნიმუშში მისი არსებობის შემთხვევაში. ცოცხალ ორგანიზმში მიმდინარე დნმ-ს ამპლიფიცირების – რეპლიკაციისგან განსხვავებით, პჯრ-ს საშუალებით ამპლიფიცირდება დნმ-ს მოკლე მონაკვეთები, რომელთა სიგრძე არ აღემატება 3000 ფუძე წყვილს (3Kbp).

პჯრ-ის სარეაქციო კომპონენტები:

პჯრ-ის ჩატარებისთვის სარეაქციო არეში საჭიროა შემდეგი კომპონენტების არსებობა:

1. პრაიმერები – ხელოვნურად სინთეზირებული ოლიგონუკლეო-ტიდები, რომელთა ზომები, როგორც წესი, არ არემატება 14 – 35 ფუძე წყვილს. ისინი საკვლევი დნმ-ს შესაბამისი უბნის იდენტურები არიან.
2. ფერმენტი Taq – პოლიმერაზა, რომელიც დნმ-პოლიმერაზას ანალოგიურია. იგი გამოყოფილი იქნა ბაქტერიიდან Thermus aquacus, რომელიც გვხვდება გეიზერებში, 60 °C-ზე მაღალი ტემპერატურის პირობებში.
3. დეზოქსინუკლეოტიდების ნარევი, რომელიც შეიცავს: დეზოქსიადენოზინტრიფოსფატს (dATP), დეზოქსიგუანოზინტრი-ფოსფატს (dGTP), დეზოქსიციტოზინტრიფოსფატს, (dCTP) და დეზოქსითიმიდინტრიფოსფატს (dTTP). ეს ნივთიერებები შეადგენენ სამშენებლო მასალას ახლადსინთეზირებული დნმ-ს ფრაგმენტებისთვის.
4. Mg+2- ს იონები, რომელიც საჭიროა ნებისმიერი ფერმენტის, მათ შორის taq – პოლიმერაზას მუშაობისთვის.
5. ბუფერი, რომელიც ქმნის პჯრ რეაქციის მიმდინარეობისათვის ხელსაყრელ პირობებს (pH, იონურ ძალა, იონები, დეტერგენტები).
6. დნმ-მატრიცა, რომელიც შეიცავს დნმ-ს იმ უბანს, რომლის ამპლიფიკაციაც უნდა მოხდეს.

რეაქცია ტარდება მცირე ზომის პოლიპროპილენის სინჯარებში. არსებობს 0,2 მკლ და 0,5 მკლ მოცულობის პჯრ-ის სინჯარები. აღნიშნულ სინჯარების სარეაქციო არით შევსების შემდეგ საჭიროა მათი ე.წ. ამპლიფიკატორში (თერმოციკლერში) მოთავსება. ეს არის

ხელსაწყო, რომელიც ახორციელებს ტემპერატურის რეჟიმის უზრუნველყოფას გაციებითა და გაცხელებით.

ტემპერატურული რეჟიმები იყოფა საფეხურებად, რომელთა ერთიანობას ციკლი ეწოდება. თითოეულო ციკლის შემდეგ ხდება ჩვენთვის საინტერესო დნმ-ს მონაკვეთის გაორმაგება.

1. დენატურაცია - ციკლის ამ ეტაპზე ახდენენ სარეაქციო არეში არსებული დნმ-ის ორმაგი ჯაჭვის დაცალკევებას. ამ პროცესისათვის საჭიროა მაღალი ტემპერატურა – 94-96°C. აღნიშნულ ტემპერატურაზე სარეაქციო ნიმუშის ინკუბირების შედეგად მიიღება დნმ-ის ორი ერთჯაჭვიანი მოლეკულა. ეტაპის ხანგრძლივობა შეადგენს 0,5-2 წუთს. რიგ შემთხვევებში, ციკლის დაწყებას წინ უსწრებს სარეაქციო ნარევის წინასწარი გაცხელება 95-96°C-ზე 2-5 წუთის განმავლობაში, დნმ-ს მოლეკულისა და პრაიმერების სრული დენატურაციის მიზნით. ამ მოვლენას ეწოდება „ცხელი სტარტი” და ხელს უშლის არასპეციფიკური პროდუქტების წარმოქმნას.

2. ანელინგი - ანელინგის სტადიაზე ხდება პირველ სტადიაზე მიღებული დნმ-ის ერთმაგ ჯაჭვებთან პრაიმერების დაკავშირება. ერთი პრაიმერი უკავშირდება ერჯაჭვიანი დნმ-ის შესაბამის უბანს, ხოლო მეორე პრაიმერი ასევე უკავშირდება მეორე ერჯაჭვიანი დნმ-ის შესაბამს უბანს. ამგვარად პრაიმერები შემოსაზღვრავენ დნმ-ის ამპლიფიცირებად მინაკვეთს. დაკავშირება ხდება კომპლემენტარულად, ჩარგაფის წესის მიხედვით, რაც ნიშნავს, რომ ორმაგჯაჭვიან დნმ-ში ადენინის საპირისპიროდ აუცილებლად არის თიმინი, ხოლო გუანინი მუდამ უწყვილდება ციტოზინს. თუ აღნიშნული პირობები არ იქნება დაცული, მაშინ ანელინგი არ განხორციელდება.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, პჯრ-ს სპეციფიკურობა დაფუძნებულია დნმ-მატრიცასა და პრაიმერებს შორის წარმოქმნილ კომპლემენტარულ კომპლექსზე. ეს კომპლექსი რომ წარმოიქმნას, აუცილებელია ტემპერატურული რეჟიმის სწორად შერჩევა. თავის მხრივ, ტემპერატურა დამოკიდებულია პრაიმერის შემადგენლობაზე და თითქმის უტოლდება პრაიმერის ლღობის ტემპერატურას (Tm).

ლღობის ტემპერატურის გამოთვლა შესაძლებელია შემდეგი ფორმულით:

$$Tm=2.(nA+nT)+4.(nG+nC)$$

სადაც nA. nT, nG და nC არის შესაბამისი ნუკლეოტიდების რაოდენობა პრაიმერში.

პრაიმერის შერჩევისას, თუ მისი სიგრძე და ნუკლეოტიდების შემცველობა ან ტემპერატურული რეჟიმი არასწორადაა გათვლილი, რეაქციისას შესაძლებელია არასპეციფიკური კომპლემენტარული კომპლექსების წარმოქმნა მატრიცული დნმ-ს სხვა მონაკვეთებთან გამოიწვევს სხვა, არასპეციფიკური პროდუქტების წარმოქმნას. ლღობის ტემპერატურის ზედა ზღვარი შეზღუდულია ფერმენტ პოლიმერაზას ტემპერატურული ოპტიმუმით, მისი აქტივობა ეცემა, თუ ტემპერატურა გადააჭარბებს 80°C-ს. პრაიმერების შერჩევისას გათვალისწინებული უნდა იქნას შემდეგი კრიტერიუმები: GC შემცველობა უნდა იყოს დაახლოებით 60%; პრაიმერების ლღობის ტემპერატურათა (Tm) შორის სხვაობა არ უნდა აღემატებოდეს 5°C-ს; ხსნარი არ უნდა შეიცავდეს არასპეციფიკურ მეორად სტრუქტურებს. სასურველია, რომ პრაიმერები ბოლოზე შეიცავდეს გუანინს ან ციტოზინს, რადგანაც ისინი წარმოქმნიან სამ წყალბადურ კავშირს მატრიცული დნმ-ს მოლეკულასთან, რაც ჰიბრიდიზაციას უფრო სტაბილურს ხდის. ტემპერატურული რეჟიმი, პრაიმერების შემცველობიდან გამომდინარე, მერყეობს 50 – 78°C შორის, დრო – 20 წამიდან 1 წუთამდე.

3. პჯრ-ს მესამე ეტაპია ელონგაცია, მიერთებული პრაიმერებიდან დაწყებული, დნმ-ს ჯაჭვის კომპლემენტარული დაგრძელება, რომელიც მიმდინარეობს 5’ ბოლოდან 3’ ბოლოს მიმართულებით. სამშენებლო მასალას ახალი დნმ-ს ჯაჭვების სინთეზისათვის წარმოადგენს საინკუბაციო არეში დამატებული დეზოქსინუკლეოტიდები. სინთეზს აკატალიზებს ფერმენტი ტაქ-პოლიმერაზა, 70-72°C ტემპერატურაზე. ეტაპის ხანგრძლივობაა 20 – 60 წუთი.

ამპლიფიკაციის პირველი ციკლის შემდეგ წარმოქმნილი დნმ-ს ახალი ჯაჭვები ემსახურებიან ამპლიფიკაციის მეორე ციკლს, როგორც დნმ- მატრიცები. ამ დროს წარმოიქმნება დნმ-ს სპეციფიკური ფრაგმენტი – ამპლიკონი. ყოველი შემდგომი ციკლისათვის აღნიშნული ამპლიკონები წარმოადგენენ მატრიცას დნმ-ს ახალი ჯაჭვების სინთეზისათვის. ამგვარად სარეაქციო არეში ხდება ამპლიკონების დაგროვება და მათი რაოდენობა გამოისახება ფორმულით 2n, სადაც n ამპლიფიკაციის ციკლების რაოდენობაა. თუ საწყის სარეაქციო არეში არის ორჯაჭვიანი დნმ-ს მხოლოდ ერთი მოლეკულა, 35 – 40 ციკლის შემდეგ არეში დაგროვდება დაახლოებით 108 ამპლიკონის მოლეკულა.

აღსანიშნავია, რომ ამპლიკონების დაგროვება გეომეტრიული პროგრესიით მიმდინარეობს დროის გარკვეულ მონაკვეთში, რის შემდეგაც იგი ძალზე მცირდება. ამ ეფექტს ეწოდება „პლატოს ეფექტი" და იგი შეიქმნება, როდესაც ამპლიკონების კონცენტრაცია მიაღწევს 0,2-1. პიკომოლ „პლატოს ეფექტზე" გავლენას ახდენს: სუბსტრატების (დეზოქსინუკლეოტიდები და პრაიმერები) უტილიზაცია, რეაგენტების სტაბილურობა (დეზოქსინუკლეოტიდები და ფერმენტები), ინჰიბიტორების რაოდენობა (პიროფოსფატები და დნმ-დუპლექსები), არასპეციფიკური პროდუქტები და პრაიმერ-დიმერები, რომლებიც კონკურირებენ დეზოქსინუკლეოტიდებისთვის, პრაიმერებისა და პოლიმერაზისთვის. რაც უფრო დაბალია საწყისი დნმ-მატრიცის კონცენტრაცია, მით მეტია „პლატოს ეფექტის" შექმნის რისკი. ეს ეფექტი შეიძლება შეიქმნას მანამდე, სანამ სარეაქციო არეში დაგროვდება შემდგომი ანალიზისთვის საჭირო ამპლიკაციის სპეციფიკური პროდუქტის რაოდენობა. [15]

2. მეთოდები

2.1 ცდის ობიექტი

ცდის ობიექტს წარმოადგენდა ბროილერის ჯიშის წიწილები, რომლებიც გადანაწილებულ იქნენ ორ ჯგუფში: საცდელ და საკონტროლო ჯგუფში, თითოეული ჯგუფი იმყოფებოდა ერთსა და იმავე პირობებში. უწყვეტად მიეწოდებოდათ საკვები და წყალი, ხოლო ოთახის ტემპერატურა შეადგენდა 30° C-ს. განსხვავება იყო მხოლოდ საკვებ რაციონს შორის. საცდელ ჯგუფს მიეწოდებოდა გლიფოსატ რეზისტენტული სოიოს შემცველი საკვები დანამატი. ხოლო საკონტროლო ჯგუფს- არა გენმოდიფიცირებული სოიოს შემცველი ბროილერისთვის განკუთვნილი საკვები. ქათმების დაკვლა მოხდა მათი სარეალიზაციო ზომის მიღწევის შემდგომ. თითოეული საკონტროლო და საცდელი ჯგუფებიდან ინდივიდუალურად მოხდა შეგროვება შემდეგი ქსოვილების: კუჭი, ღვიძლი და კუნთი. თითოეული ორგანო დამუშავდა პიპოქლორიდის ხსნარით და მოხდა მათი განთავსება სათითაოდ კონტეინერში. აღნიშნული კონტეინერები მოვათავსეთ სამაცივრე პირობებში +4-6° C-ზე.

2.2. დნმ-ს ექსტრაქცია

დნმ-ის ექსტრაქცია მოვახდინეთ ორი განსხვავებული მეთოდით: ,,InstaGene'' ხელატორული მიკრო ნაწილაკებითა და ,,Spin Column'' მინი სვეტებით ექსტრაქციის მეთოდით. ,,InstaGene'' ხელატორული მიკრო ნაწილაკებით დნმ-ის ექსტრაქცია განსხვავებით ,,Spin Column'' მინი სვეტებით ექსტრაქციის მეთოდისგან, არ ხასიათდება დნმ-ის მაღალი გამოსავლიანობით. ეს მეთოდი ეფექტურია ჰომოგენური ნიმუშების შემთხვევაში და სხვა მეთოდებისგან განსხვავებით ხასიათდება დაბალი ფასით. ,,Spin Column'' მინი სვეტებით ექსტრაქციის მეთოდი არის უფრო დახვეწილი მეთოდი, ხასიათდება დნმ-ის მაღალი გამოსავლიანობით, გამოიყენება ჰეტეროგენული ნიმუშების შემთხვევაშიც. გამოყოფილი დნმ გამოირჩევა მაღალი კონცენტრაციითა და სისუფთავით, რაც ძალიან მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს პჯრ-ის წარმართვისას.

2.2.1დნმ-ს ექსტრაქცია Bio-Rad-ს კიტის მიხედვით

დნმ–ს ექსტრაქცია განხორციელდა „**Biotechnology Explorer, GMO Investigator Kit, Catalog #166-2500 EDU**“– ს მიხედვით

ხსნარები: InstaGene matrix

ბიდისტილირებული წყალი

ძირითადი ხელსაწყოები: ჰომოგენიზატორი

ცენტრიფუგა

დამხმარე ხელსაწყოები/ ჭურჭელი: ელექტრონული სასწორი;

ვარიაბელური პიპეტი;

ხრახნიანი სინჯარა;

ცირკონის ბურთულები;

ლანცეტი;

პინცეტი.

ნიმუშის მომზადება და დნმ-ს გამოყოფა ყველა ნიმუშისთვის ერთმანეთისგან იზოლირებულად განხორციელდა ჯვარედინი დაბინძურების თავიდან ასაცილებლად.

დნმ–ს ექსტრაქციის ეტაპები:

1. 2 მლ-იან ხრახნიან სინჯარებში გადაგვაქვს 7 ცალი ცირკონის ბურთულები

2. საკვლევი ობიექტიდან ვიღებთ 200 მგ ქსოვილს და გადაგვაქვს ხრახნიან 2 მლ-იან სინჯარებში
3. ვათავსებთ ჰომოგენიზატორში და ვახდენთ მშრალ ჰომოგენიზირებას 2 წუთის განმავლობაში
4. ჰომოგენიზირების შემდგომ თითოეულ სინჯარას ვუმატებთ 1 მლ ბიდისტირილებულ წყალს
5. ვათავსებთ ჰომოგენიზატორში და ვახდნეთ ჰომოგენიზირებას 2 წუთის განმავლობაში.
6. 1.5 მლ-იან სინჯარებში გადაგვაქვს 500 მკლ InstaGene
7. ყოველ სინჯარაში ვამატებთ 50 მკლ ჰომოგენატს და ვავორტექსებთ
8. ვათავსებთ მშრალ აბაზანაში 5 წუთის მანძილზე 96° C-ზე
9. ინკუბაციის შემდგომ ვახდენთ დაცენტრიფუგირებას 6000 g-ზე 5 წუთის მანძილზე
10. ვიღებთ 200 მკლ სუპერნატანტს და ვინახავთ მაცივარში -20˚C-ზე შემდგომ ეტაპამდე

2.2.2 დნმ-ს ექსტრაქცია SUREFOOD PREP BASIC კიტის მიხედვით

დნმ–ს ექსტრაქცია განხორციელდა „**SUREFOOD PRPEP BASIC ART. No. S1052-** ს" მიხედვით.

გამოყენებული ხსნარები: ლიზის ბუფერი (ბუფერი L),ბაინდინგ ბუფერი (ბუფერი B); პრევოშ (ბუფერი P), ვოშ ბუფერი (ბუფერი W), ელუშენ ბუფერი (ბუფერი E), ეთანოლი, პროეინაზა K, დეიონიზირებული წყალი.

დამხმარე ხელსაწყოები/ ჭურჭელი: ელექტრონული სასწორი,

ვორტექსი,

მიკროცენტრიფუგა,

მშრალი თერმოაბაზანა

ვარიაბელური ავტომატური პიპეტი (100-1000 µl)

ვარიაბელური ავტომატური პიპეტი (10-100 µl)

შემაგროვებელი სინჯარა 2მლ-იანი

მიმღები ფილტრი მწვანე

მიმღები ფილტრი ყვითელი

შემგროვებელი სინჯარა 1.5 მლ-იანი

უშუალოდ ცდის დაწყებამდე საჭიროა:

1. ლიზის ბუფერის გათბობა 65°C -მდე და კარგად შენჯღრევა პრეციპიტატის გასაქრობად
2. ბუფერ W-ს და P-ს დაემატოს ეთანოლი (96–100%) ,
3. მშრალი აბაზანა უნდა გათბეს 65 °C -მდე.

ცდის მსვლელობა :

1. ვიღებთ 2 მლ-იან ხრახნიან ეპენდორფებს და გადაგვაქვს 10 ცალი ცირკონის ბურთულა
2. თითოელ ეპენდორფში გადაგვაქვს 200 მგ ნიმუში და ვუმატებთ 1 მლ ლიზის ბუფერს
3. ეფენდორფებს ვათავსებთ ჰომოგენიზარტორში და ვახდენთ ჰომოგენიზირებას 2 წთ-ს განმავლობაში
4. დაჰომოგენიზირებული ნიმუშებს ვათავსებთ ცენტრიფუგაში და ვაცენტრიფუგირებთ 1000 g-ზე 30 წმ-ის განმავლობაში
5. ვიღებთ 200 მკლ ჰომოგენატის პრეციპიტატს და გადაგვაქვს 1.5 ეპენდორფებში
6. თითოეულ ნიმუშს ვუმატებთ 400 მკლ ლიზის ბუფერს და 20 მკლ პროტეინაზა K-ს და კარგად ვავორტექსებთ
7. დავორტექსებულ ნიმუშებს ვათავსებთ მშრალ აბაზანაზე 65^0 C-ზე 30 წუთის განმავლობაში

8. ინკუბაციის შემდგომ ნიმუშებს ვაცენტრიფუგირებთ 1 წუთის განმავლობაში 12000 g-ზე
9. დაცენტრიფუგირების შემდგომ საკვლევი ნიმუშებიდან ვიღებთ 350 მკლ სუპერნატანტს და გადაგვაქვს 2 მლ-იან ეპენდორფებში, მწვანე მიმღებ ფილტრებზე
10. ვაცენტრიფუგირებთ 1 წუთის განმავლობაში 12000 g-ზე
11. მიმღებ მწვანე ფილტრებს ვყრით ხოლო ფილტრატს ვუმატებთ 200 მკლ ბუფერ B-ს და კარგად ვავორტექსებთ
12. დავორტექსების შემდეგ ხსნარის მთლიანი მოცულობა (550 მკლ) გადაგვაქვს 2 მლ-იან ეპენდორფებში, ყვითელ მიმღებ ფილტრებზე
13. ვაცენტრიფუგირებთ 1 წუთის განმავლობაში 12000 g-ზე
14. ფილტრატს ვღვრით, ხოლო ფილტრებზე დაგვაქვს 550 მკლ ბუფერი P
15. ვაცენტრიფუგირებთ 1 წუთის განმავლობაში 12000 g-ზე
16. ფილტრატს ვღვრით, ხოლო ფილტრებზე დაგვაქვს 550 მკლ ბუფერი W და ვიმეორებთ ორჯერ
17. მეორე რეცხვის შემდგომ ვღრით ფილტრატს და ვაცენტრიფუგირებთ 12000 g-ზე 2 წუთის განმავლობაში
18. ფილტრები გადაგვაქვს ახალ 1.5 მლ-იან მიმღებში
19. ვუმატებთ წინასწარ 65^0 C-ზე შემთბარ ბუფერ E-ს
20. ინკუბაცია მშრალ აბაზანაში 65^0 C-ზე 4 წთ-ს განმავლობაში
21. ინკუბაციის შემდგომ ვანცეტრიფუგირებთ 10000 g-ზე 1 წუთის განმავლობაში
22. ფილტრატს ვზომავთ სპეციალურ ხელსაწყო - ნანოდროფზე
23. მიღებულ დნმ-ს ვინახავთ -20^0 C-ზე, შემდგომ კვლევებამდე

2.3 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

საკვლევი ობიექტი: ცხოველთა საკვები დანამატიდან ექსტრაგირებული დნმ, საცდელი და საკონტროლო ჯგუფის ორგნოებიდან (პოტენციური სუბპროდუქტებიდან): კუჭი, ღვიძლი, კუნთი ექსტრაგირებული დნმ.

ხსნარები: Roundup Ready Soybean გენსპეციფიკური გმო მარკერი (გმო)

Roundup Ready Soybean-ის ლექტინის მარკერი (ლექ)

Roundup Ready Soybean გმო გენსპეციფიკური დადებითი კონტროლი

Taq პოლიმერაზა

დამხმარე ხელსაწყოები/ ჭურჭელი: 1.5 მლ-იანი ეპენდორფი;

PCR სინჯარა;

1-20 µl პიპეტი;

100-1000 µl პიპეტი;

თერმოციკლერი;

ვორტექსი;

მინიცენტრიფუგა;

1) ექსპერიმენტის დაწყებამდე PCR სინჯარები გადაინომრება შესატანი ნიმუშების შესაბამისად
2) 1.5 მლ-იანი ეპენდორფში გადაგვაქვს გმო მასტერ მიქსი და ვამატებთ Taq პოლიმერაზას. მიღებული მასტერ მიქსს (მმ)გადავანაწილებთ PCR სინჯარებში
3) 1.5 მლ-იანი ეპენდორფში გადაგვაქვს ლექტინსპეციფიკური მასტერ მიქსი და ვამატებთ Taq პოლიმერაზას. მიღებული მასტერ მიქსს (მმ)გადავანაწილებთ PCR სინჯარებში
4) PCR სინჯარებში გადატანამდე გამოყოფილი დნმ-ს სინჯარებს ვავორტექსებთ და ვაცენტრიფუგირებთ 5000 g-ზე 30 წმ-ის განმავლობაში
5) PCR სინჯარებში გადაგვაქვს საკვლევი ნიმუში 5-5 მკლ.
6) ვაცენტრიფუგირებთ 12000 g-ზე 30 წმ-ის განმავლობაში

7) სინჯარებს ვათავსებთ თერმოციკლერში და ვაპროგრამებთ ცხრილი 1–ს შესაბამისად.

ცხრილი1. PCR თერმოციკლერის მუშაობის რეჟიმი

საფეხური	ფუნქცია	ტემპერატურა	ხანგრძლივობა	ციკლების რაოდენობა
პირველად დენატურაცია	დენატურაცია	94^0 C	10 წთ	1
პჯრ ამფლიპიკაცია	დენატურაცია	94^0 C	25 წმ	50
	ანელინგი	62^0 C	30 წმ	
	ელონგაცია	72^0 C	45 წმ	
საბოლოო ეტაპი	ელონგაცია	72^0 C	3 წთ	1
დაყოვნება	დაყოვნება	4^0 C	განუსაზღვრელი	1

8) პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის ციკლების დამთავრების შემდეგ ნიმუშები ინახება საყინულეში - 20 ˚C-ზე.

2.4 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტების ელექტროფორეზი

საკვლევი ობიექტი: პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტები.

ხსნარები: აგაროზას გელი;

1x TAE ბუფერი.

ეთიდიუმ ბრომიდი

დამხმარე ხელსაწყოები/ ჭურჭელი: გელ ელექტროფორეზი;

მიკროტალღოვანი ღუმელი;

ელექტრონული სასწორი;

500მლ დანაყოფებიანი ცილინდრი;

100მლ თერმოგამძლე კოლბა;

1-20 µl პიპეტი.

1. აგაროზის გელის დასამზადებლად 30 მლ 1x TAE ბუფერში უნდა გაიხსნას 0.9გ აგარის ფხვნილი და გასალღობად იდგმება მიკროტალღოვან ღუმელში 3 წუთის განმავლობაში.
2. მიღებული გამლღვალი მასა გრილდება 60˚C-მდე
3. აგარის გელის ფორმაში
   გადაგვაქვს 30მლ აგარის გელი(დაახლოებით 0.5სმ-ის სიღმის ფენა)
4. აგაროზის გელში თავსდება 2 , 10 კბილიანი , სახაზავი და ყოვნდება
   გასამყარებლად 20 წთ.
5. გელის გამყარების შემდეგ ,მოშორდება გელის სამაგრი ფორმები, სახაზავები და ელექტროფორეზის აპარატი შეივსება 1x TAE ბუფერით.
6. აგაროზის გელის ფოსოებში გადაგვაქვს სახაზავი და პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტები .

2.5 პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში

პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში განხორციელდა „**SUREFOOD Animal Invetgation Kit Art. No. S56119-** ს" მიხედვით.

საკვლევი ობიექტი: ცხოველთა საკვები დანამატიდან ექსტრაგირებული დნმ, საცდელი და საკონტროლო ჯგუფის ორგნოებიდან (პოტენციური სუბპროდუქტებიდან): კუჭი, ღვიძლი, კუნთი ექსტრაგირებული დნმ.

ხსნარები: მასტერ მიქსი

დადებითი კონტროლი

დამხმარე ხელსაწყოები/ ჭურჭელი: 1.5 მლ-იანი ეპენდორფი;

PCR სინჯარა;

1-20 µl პიპეტი;

100-1000 µl პიპეტი;

თერმოციკლერი;

ვორტექსი;

მინიცენტრიფუგა;

1. ექსპერიმენტის დაწყებამდე PCR სინჯარები გადაინომრება შესატანი ნიმუშების შესაბამისად
2. თითოეულ სინჯარაში შეგვაქვს 20 მკლ მასტერ მიქსი
3. PCR სინჯარებში გადატანამდე გამოყოფილი დნმ-ს სინჯარებს ვავორტექსებთ და ვაცენტრიფუგირებთ 5000 g-ზე 30 წმ-ის განმავლობაში
4. ყველა სინჯარაში, გარდა პოზიტიური კონტროლისთვის განკუთვნილისა, შეგვაქვს 5 მკლ საკვლევი დნმ
5. ვაცენტრიფუგირებთ 12000 g-ზე 30 წმ-ის განმავლობაში
6. სინჯარებს ვათავსებთ თერმოციკლერში და ვაპროგრამებთ ცხრილი 2–ს შესაბამისად.

საფეხური	ფუნქცია	ტემპერატურა	ხანგრძლივობა	ციკლების რაოდენობა
პირველად დენატურაცია	დენატურაცია	95^0 C	5 წთ	1
პჯრ ამფლიპიკაცია	დენატურაცია	95^0 C	15 წმ	35
	ანელინგი	60^0 C	30 წმ	
	ელონგაცია	72^0 C	45 წმ	
საბოლოო ეტაპი	ელონგაცია	72^0 C	3 წთ	1

ცხრილი2. PCR თერმოციკლერის მუშაობის რეჟიმი

2.6 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (პჯრ - რეალურ დროში) გენმოდიფიცირებული სოიოს რაოდენობრივი ანალიზი

პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში განხორციელდა „SureFood® GMO QUANT RoundUp Ready Soya"; SureFood® GMO QUANT RR2Y Soya-ს მიხედვით.

საკვლევი ობიექტი: ცხოველთა საკვები დანამატიდან ექსტრაგირებული დნმ

ხსნარები: სოიოს სარეაქციო მიქსი

სპეციფიკირი გენის (RR/RR2Y) სარეაქციო მიქსი

Taq პოლიმერაზა

გამხსნელი ბუფერი

სტანდარტული დნმ

დადებითი კონტროლი (100 მკლ/ 1% RR/RR2Y სოიო)

დამხმარე ხელსაწყოები და ჭურჭელი : PCR სინჯარა;

1-20 µl პიპეტი;

100-1000 µl პიპეტი;

1.5 მლ-იანი ეპენდორფი;

თერმოციკლერი;

ვორტექსი;

მინიცენტრიფუგა;

1. ექსპერიმენტის დაწყებამდე საჭიარო მომზადდეს მასტერ მიქსი - ცხრილი 3- ის მიხედვით

მასტერ მიქსის კომპონენეტები	**თითოეული რეაქციის ოდენობა**	**10 რეაქცია (10%-ით მეტი)**
სოიოს სარეაქციო მიქსი ან 35S სარეაქციო მიქსი	19.9 მკლ	218.9 მკლ
Taq პოლიმერაზა	0.1 მკლ	1.1 მკლ
საერთო მოცულობა	**20 მკლ**	**220.0 მკლ**

ცხრილი 3. მასტერ მიქსის მომზადება გადაანგარიშებული 1 და 10 ნიმუშზე

2. ცდის დაწყებამდე აუცილებელია მომზადდეს სტანდარტული დნმ განზავებება. (იხ. ცხრილი 4)

სტანდარტი	განზავება	თითოეულ მკლ-ში ასლების რაოდენობა	თითოეული რეაქციისთვის საბოლოო ასლების რაოდენობა
S1	45მკლ გამხსნელი ბუფერი +5 მკლ სტანდარტული დნმ	100 000 ასლი	500 000 ასლი
S2	45მკლ გამხსნელი ბუფერი +5 მკლ დნმ S1-დან	10 000 ასლი	50 000 ასლი
S3	45მკლ გამხსნელი ბუფერი +5 მკლ დნმ S2-დან	1000 ასლი	5000 ასლი
S4	45მკლ გამხსნელი ბუფერი +5 მკლ დნმ S3-დან	100 ასლი	500 ასლი
S5	45მკლ გამხსნელი ბუფერი +5 მკლ დნმ S4-დან	10 ასლი	50 ასლი

ცხრილი 4. სტანდარტული დნმ-ის განზავება

3. 20 მკლ მასტერ მიქსი პიპეტირება შესაბამისს პჯრ სინჯარებში.

4. 5 მკლ სტანრდატების გადატანა შესაბამის სინჯარაში
5. 5 მკლ საკვლევი დნმ-ის გადატანა შესაბამის სინჯარაში
6. დაცენტრიფუგირება 5000 g-ზე 30 წმ-ს განმავლობაში
7. სინჯარებს ვათავსებთ თერმოციკლერში და ვაპროგრამებთ ცხრილი 5–ს შესაბამისად.

	ბლოკციკლერი/ლაითციკლერი
საწყისი დენატურაცია ციკლები დენატურაცია ანელინგი/ექსტენცია	5 წთ, 95°C 45 15 წმ, 95°C 30 წმ, 60°C
ტემპერატურის გადასვლის სიჩქარე/ასვლის სიჩქარე	მაქსიმალური
ფლუორესცენციის დეტექცია	ფლუორესცენტული საღებავი - FAM

ცხრილი 5. პჯრ რეალურ დროში მუშაობის რეჟიმი

ნიმუშის დნმ-ის გმო-ს შემცველი RR/RR2Y და Soya ასლების რიცხვი და დადებითი კონტროლის გამოთვლა შეიძლება განისაზღვროს შემდეგი გზით(მაგ.):

ნიმუში RR/RR2Y 1350 ასლი დადებითი კონტროლი RR/RR2Y 400 ასლი

ნიმუში Soya 45000 ასლი დადებითი კონტროლი Soya 28000 ასლი

სპეციფიკური სისტემის ასლების რიცხვი გავყოთ ეტალონური გენის სისტემის ასლების რიცხვზე და გავამრავლოთ 100-ზე პროცენტის მისაღებად.

RR/RR2Y შემცველობა = RR/RR2Y ასლების რიცხვი * 100 / Soya ასლების რიცხვზე

ამასთანავე გასათვალისწინებელია ის ფაქტი, რომკორელაციის კოეფიციენტი $R^2 > 0.98$. თუ K >1 -ზე ამ შემთხვევაში 1-ს ვუფარდებთ მიღებული შედეგს და ამის შემდგომ გადავითვლით ნიმუშში გენმოდიფიცირებულ რაოდენობას.

2.7 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (პჯრ - რეალურ დროში) მცენარეული გენომის განმსაზღვრელი ანალიზი

პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში განხორციელდა SUREFOOD Plant Plus Art. No. S2049 - ს მიხედვით.

საკვლევი ობიექტი: საცდელი და საკონტროლო ჯგუფის ორგნოებიდან (პოტენციური სუბპროდუქტებიდან): კუჭი, ღვიძლი, კუნთი ექსტრაგირებული დნმ.

ხსნარები: მასტერ მიქსი

დადებითი კონტროლი

Taq პოლიმერაზა

დამხმარე ხელსაწყოები/ ჭურჭელი: 1.5 მლ-იანი ეპენდორფი;

PCR სინჯარა;

1-20 µl პიპეტი;

100-1000 µl პიპეტი;

თერმოციკლერი;

ვორტექსი;

მინიცენტრიფუგა;

ექსპერიმენტის დაწყებამდე საჭიარო მომზადდეს მასტერ მიქსი - ცხრილი 6- ის მიხედვით

მასტერ მიქსის კომპონენეტები	**თითოეული რეაქციის ოდენობა**	**10 რეაქცია (10%-ით მეტი)**
სოიოს სარეაქციო მიქსი ან 35S სარეაქციო მიქსი	19.9 მკლ	218.9 მკლ
Taq პოლიმერაზა	0.1 მკლ	1.1 მკლ
საერთო მოცულობა	**20 მკლ**	**220.0 მკლ**

ცხრილი 6. მასტერ მიქსის მომზადება გადაანგარიშებული 1 და 10 ნიმუშზე

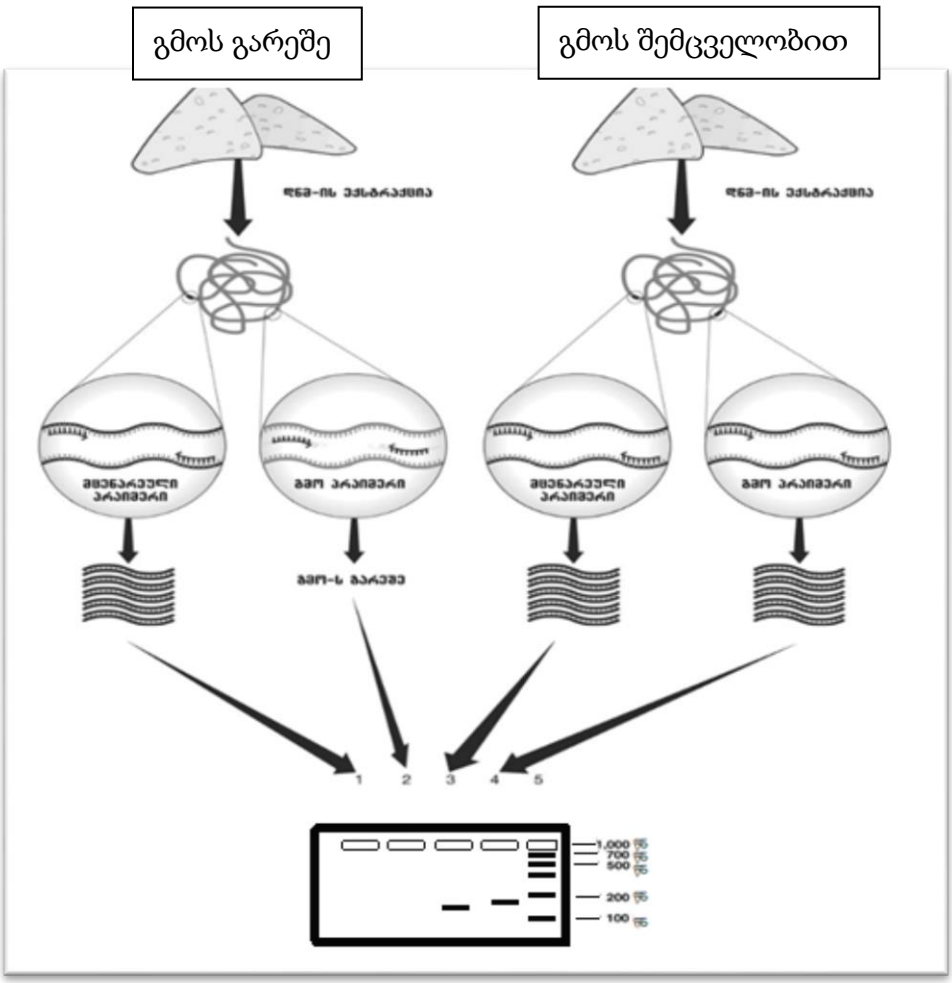
1. თითოეულ სინჯარაში შეგვაქვს 20 მკლ მასტერ მიქსი
2. PCR სინჯარებში გადატანამდე გამოყოფილი დნმ-ს სინჯარებს ვავორტექსებთ და ვაცენტრიფუგირებთ 5000 g-ზე 30 წმ-ის განმავლობაში
3. ყველა სინჯარაში, გარდა პოზიტიური კონტროლისთვის განკუთვნილისა, შეგვაქვს 5 მკლ საკვლევი დნმ
4. ვაცენტრიფუგირებთ 12000 g-ზე 30 წმ-ის განმავლობაში
5. სინჯარებს ვათავსებთ თერმოციკლერში და ვაპროგრამებთ ცხრილი 7–ს შესაბამისად.

	ბლოკციკლერი/ლაითციკლერი
საწყისი დენატურაცია ციკლები დენატურაცია ანელინგი/ექსტენცია	**5 წთ, 95°C 45 15 წმ, 95°C 30 წმ, 60°C**
ტემპერატურის გადასვლის სიჩქარე/ასვლის სიჩქარე	**მაქსიმალური**
ფლუორესცენციის დეტექცია	**ფლუორესცენტული საღებავი - FAM**

ცხრილი 7. პჯრ რეალურ დროში მუშაობის რეჟიმი

შედეგები და განხილვა

დნმ-ეთიდიუმბრომიდის კომპლექსი ულტრაიისფერი სხივებით დასხივებისას ფლუორესცენირებს. RRS გმო მარკერის არსებობის შემთხვევაში დასინთეზირდება 128 ნ.წ სიგრძის მონაკვეთი, ხოლო ლექტინის არსებობის შემთხვევაში 118 ნ.წ სიგრძის მონაკვეთი. შესაბამისი უბნების არსებობის შემხვევაში შესაბამისად აგაროზას გელის ტრანსილუმინატორზე გაშუქებისას ნათება იქნება 128 / 118 ნ.წ უბანში.



სქემა1. ცხოველთა საკვები დანამატის გენმოდიფიცირებულობაზე კვლევის შედეგები

3.1 ცხოველთა საკვები დანამატიდან ექსტრაგირებული დნმ-ს პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტების ელექტროფორეზი

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის შედეგად მიღებულ ამპლიკონებს დავუმატეთ სპეციალური საღებავი - “Loading dye”. საკვლევ ობიექტს წარმოადგენა საკონტროლო და საცდელის ჯგუფის საკვები. მათი შეტანა გელის ფოსოებში მოვახდინეთ ცხრილი 8-ის მიხედვით. ნიმუშების შეღებვა მოვახდინეთ ეთიდიუმბრომიდის მეშვეობით, რის შემდეგაც მოვახდინეთ მათი გაშუქება ტრანსილუმინატორზე. გამოკვლეული ნიმუშებით დადასტურდა რომ საკონტროლო ჯგუფის საკვები არ იყო გენმოდიფიცირებული, ხოლო საცდელი ჯგუფის საკვები კი აღმოჩნდა გენმოდიფიცირებული Roundup Ready Soybean შემცველი. (იხილეთ ფოტო 1)

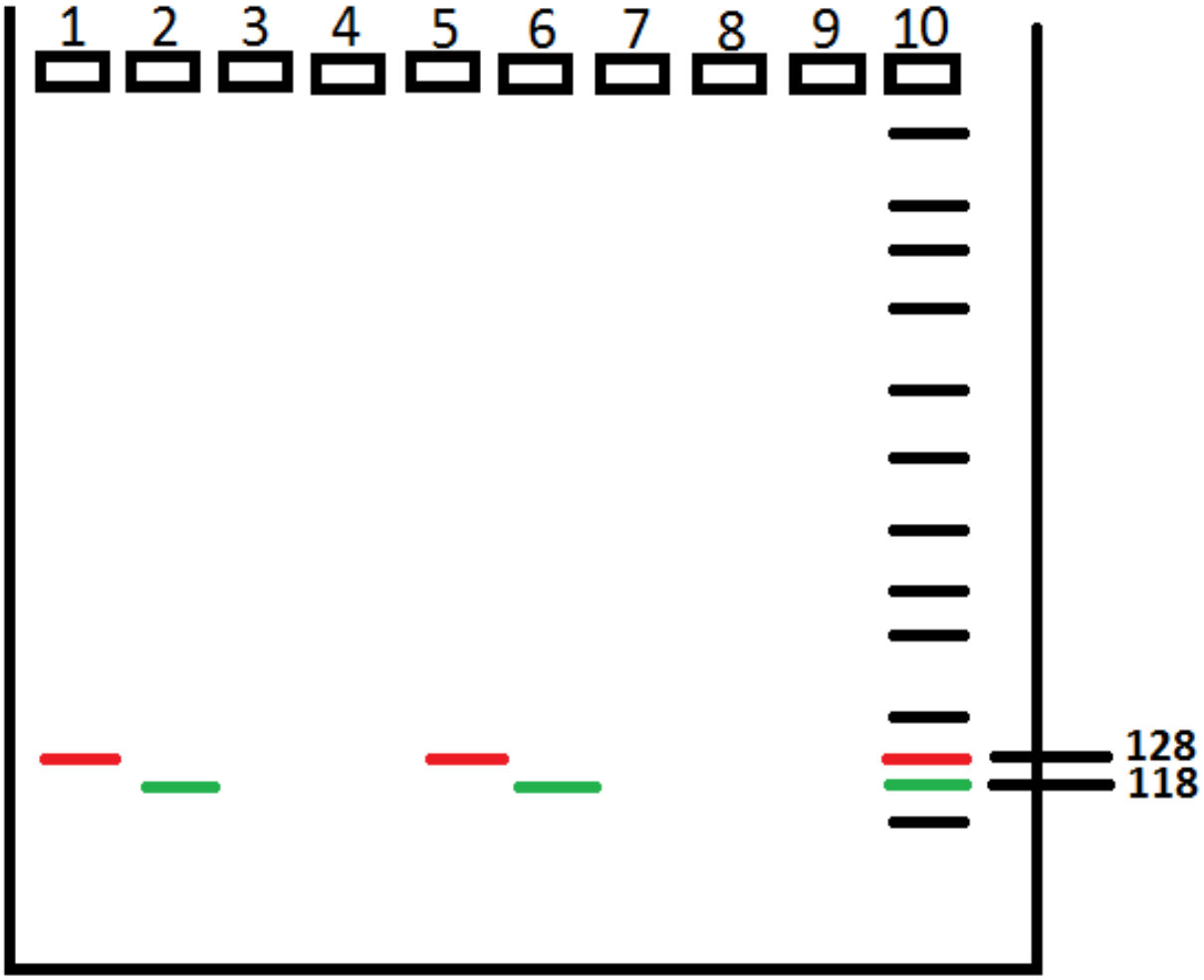
ცხრილი 7. ანალიზისათვის არჩეული ფრინველთა საკვები დანამატები

ნიმუში1	საცდელი ჯგუფისთვის განკუთვნილი საკვები
ნიმუში2	საკონტროლო ჯგუფისთვის განკუთვნილი საკვები

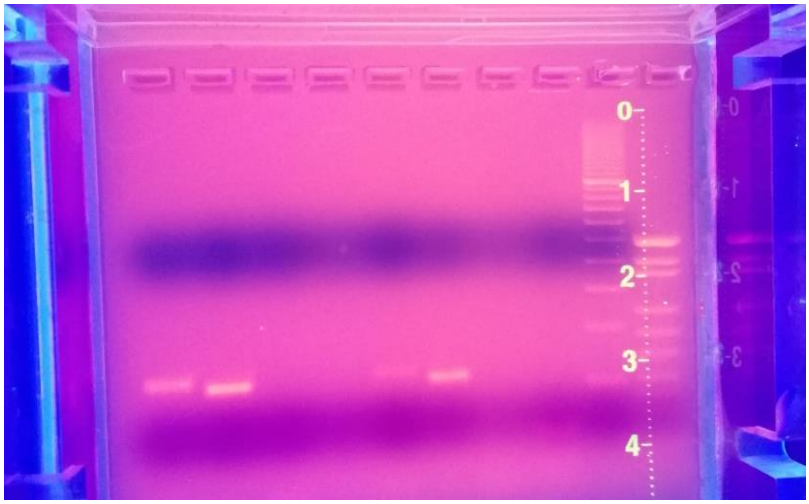
ცხრილი 8. ელექტროფორეზის გელის ფოსოებში მოთავსებული ნიმუშები.

N	ნიმუშის დასახელება
1	დადებითი კონტროლი
2	დადებითი კონტროლი
3	კონტროლის საკვები
4	კონტროლის საკვები
5	საკონტროლო ჯგუფის საკვები

6	აკონტროლო ჯგუფის საკვები
7	ექსტრაქციის კონტროლი
8	ექსტრაქციის კონტროლი
9	მოლეკულური სახაზავი
10	მოლეკულური სახაზავი



სქემა2. PCR პროდუქტების გელ ელექტროფორეზის შედეგის ბლოკ სქემა.



ფოტო 1. ცხოველთა საკვები დანამატიდან ექსტრაგირებული დნმ-ს პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტების ელექტროფორეზის შედეგები

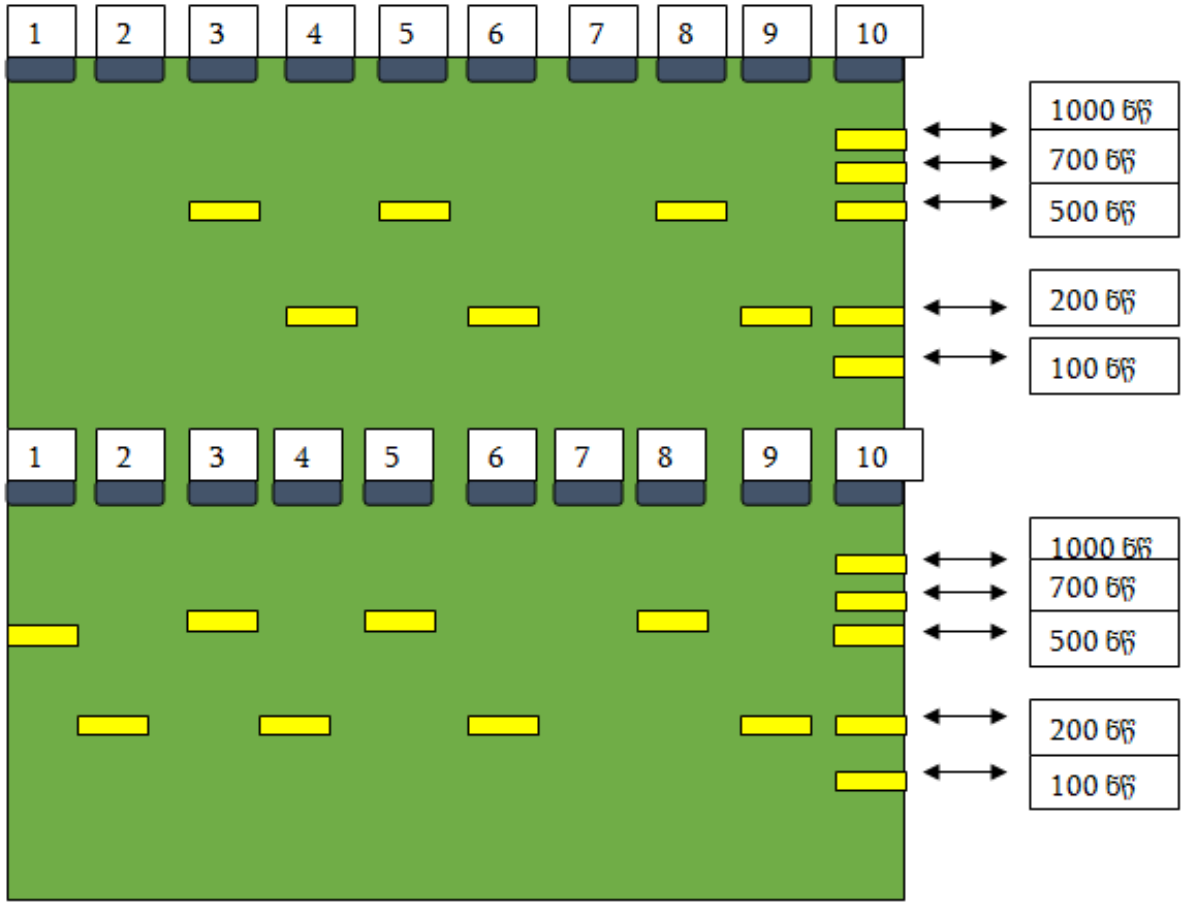
3.2 საცდელი და საკონტროლო ჯგუფის ექსკრემენტების კვლევის შედეგი P35'S , T'NOS და PSII-ის შემცველობაზე

ცხრილი9. ექსკრემენტებიდან დნმ-ს გამოყოფის მეთოდები ნიმუშების მიხედვით.

ნიმუშის ნომერი	გამოყოფის მეთოდი
1.	QIAGEN-ს კიტი
2.	Bio-Rad-ს კიტი
3.	QIAGEN-ს კიტი
4.	QIAGEN-ს კიტი
5.	QIAGEN-ს კიტი
6.	Bio-Rad-ს კიტი
7.	QIAGEN-ს კიტი

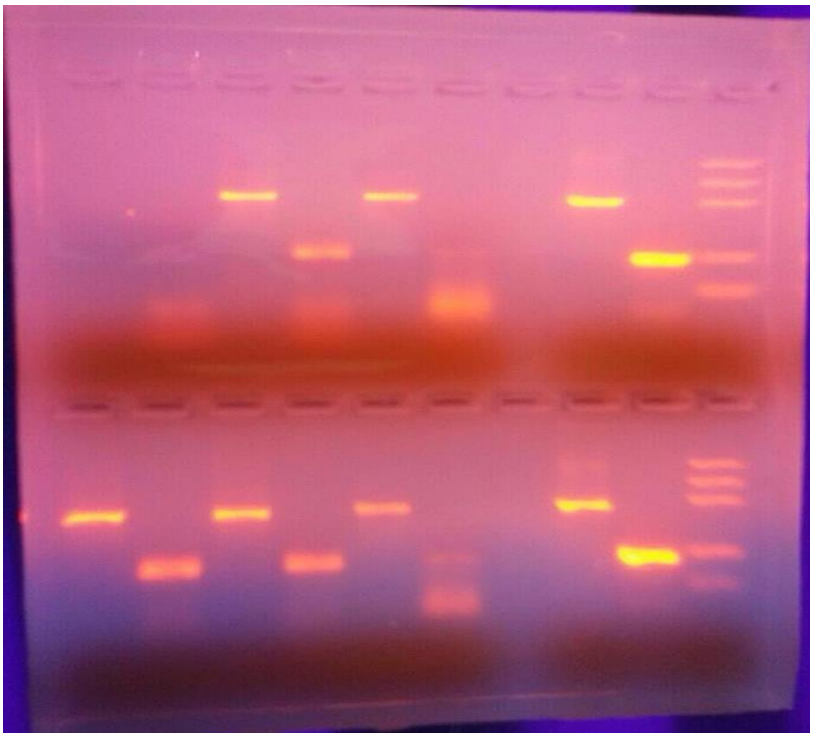
ცხრილი 10. აგაროზას გელის ფოსოებში დატანილი ნიმუშები

I	II
1 . კონტროლ ნიმუში დნმ- მატრიცის გარეშე(მც.მმ)	1. ნიმუში 4 მც. მმ(QIAGEN)
2. კონტროლ ნიმუში დნმ- მატრიცის გარეშე(გმო .მმ)	2. ნიმუში 4 გმო.მმ(QIAGEN)
3. ნიმუში 1 მც.მმ (QIAGEN)	3. ნიმუში 5 მც. მმ(QIAGEN)
4. ნიმუში 1 გმო .მმ(QIAGEN)	4. ნიმუში 5 გმო მმ(QIAGEN)
5. ნიმუში 2 მც.მმ(Bio-Rad)	5. ნიმუში 6 მც.მმ(Bio-Rad)
6. ნიმუში 2 გმო .მმ(Bio-Rad)	6. ნიმუში 6 გმო მმ(Bio-Rad)
7. ნიმუში 3 გმო მმ(კონტროლ ჯგუფი) (QIAGEN)	7. ნიმუში 7 გმო მმ(კონტროლ ჯგუფი) (QIAGEN)
8. ნიმუში 3 მც. მმ(კონტროლ ჯგუფი) (QIAGEN)	8. ნიმუში 7 გმო მმ(კონტროლ ჯგუფი) (QIAGEN)
9. დადებითი კონტროლი გმო მმ	9. დადებითი კონტროლი გმო მმ
10. მოლეკულური მასის სახაზავი	10.მოლეკულური მასის სახაზავი



სქემა3. PCR პროდუქტების გელ ელექტროფორეზის შედეგის ბლოკ სქემა.

ელექტროფორეზის გელის ტრანსილუმინატორზე გაშუქების შედეგად დავადგინეთ რომ P35'S , T'NOS და PSII-ის სპეციფიკური მარკერები არ დეგრადირდებიან საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში და გვხდებიან ფრინველების ექსკრემენტებში.



ფოტო 2. PCR პროდუქტების გელ ელექტროფორეზის შედეგი

ცხრილი11. საცდელი და საკონტროლო ჯგუფის ექსკრემენტების კვლევის შედეგი P35'S , T'NOS და PSII-ის შემცველობაზე(14დღის ინდივიდები)

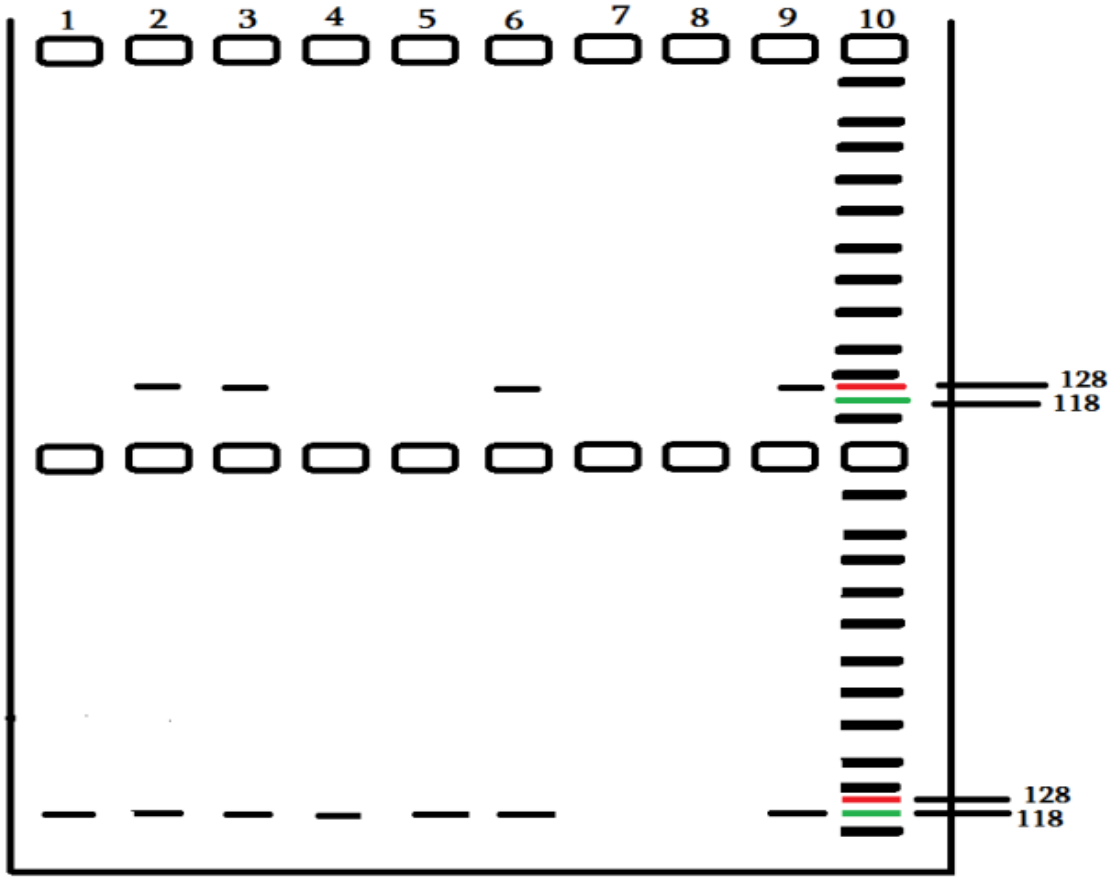
ნიმუშის ნომერი	გამოყოფის მეთოდი	P35S და T'NOS –ს შესაბამისი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა	PSII–ს შესაბამისი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა
1.	QIAGEN	+	+
2.	Bio-Rad	+	+
3.	QIAGEN(კონტროლ ჯგუფი)	-	+
4.	QIAGEN	+	+
5.	QIAGEN	+	+
6.	Bio-Rad	+	+
7.	QIAGEN(კონტროლ ჯგუფი)	-	+

3.3 InstaGene'' ხელატორული მიკრო ნაწილაკებით ექსტრაგირებული დნმ-ის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

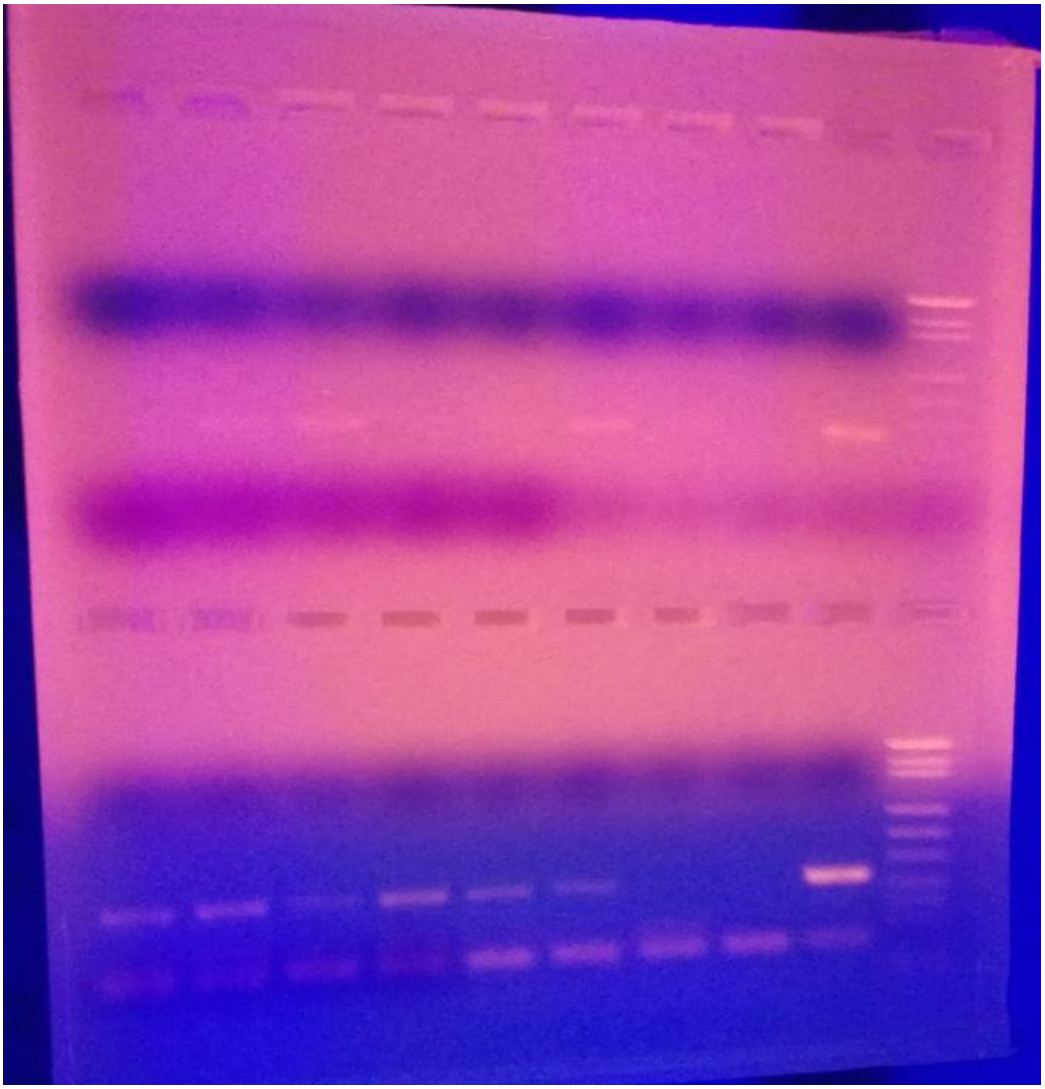
პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის შედეგად მოვახდინეთ ამპლიფიცირება **InstaGene'' ხელატორული მიკრო ნაწილაკებით** ექსტრაგირებული დნმ-ის. მიღებულ ამპლიკონებს დავუმატეთ სპეციალური საღებავი - "Loading dye". საკვლევ ობიექტს წარმოადგენა საკონტროლო და საცდელის ჯგუფების ორგანოებიდან (პოტენციური სუბროდუქტებიდან) ექტრაგირებული დნმ. მათი შეტანა გელის ფოსოებში მოვახდინეთ ცხრილი 5-ის მიხედვით. ნიმუშების შევღებეთ ეთიდიუმბრომიდის მეშვეობით, რის შემდეგაც მოვახდინეთ მათი გაშუქება ტრანსილუმინატორზე, სადაც გმო მარკერის შემთხვევაში სამი ნათება დაფიქსირდა, ხოლო სოიოს ლექტინის არეში კი ექვსი. (იხილეთ ფოტო 2)

ცხრილი 12. ელექტროფორეზის გელის ფოსოებში მოთავსებული ნიმუშები.

Rounup Ready Soybean Gmo მარკერი		Rounup Ready Soybean ლექტინის მარკერი	
1	კუჭი	1	კუჭი
2	კუჭი	2	კუჭი
3	კუნთი	3	კუნთი
4	კუჭი	4	კუჭი
5	კუნთი	5	კუნთი
6	კუნთი	6	კუნთი
7	კუჭი	7	კუჭი
8	კუნთი	8	კუნთი
9	დადებითი კონტროლი	9	დადებითი კონტროლი
10	მოლეკულური სახაზავი	10	მოლეკულური სახაზავი



სქემა4. PCR პროდუქტების გელ ელექტროფორეზის შედეგის ბლოკ სქემა.



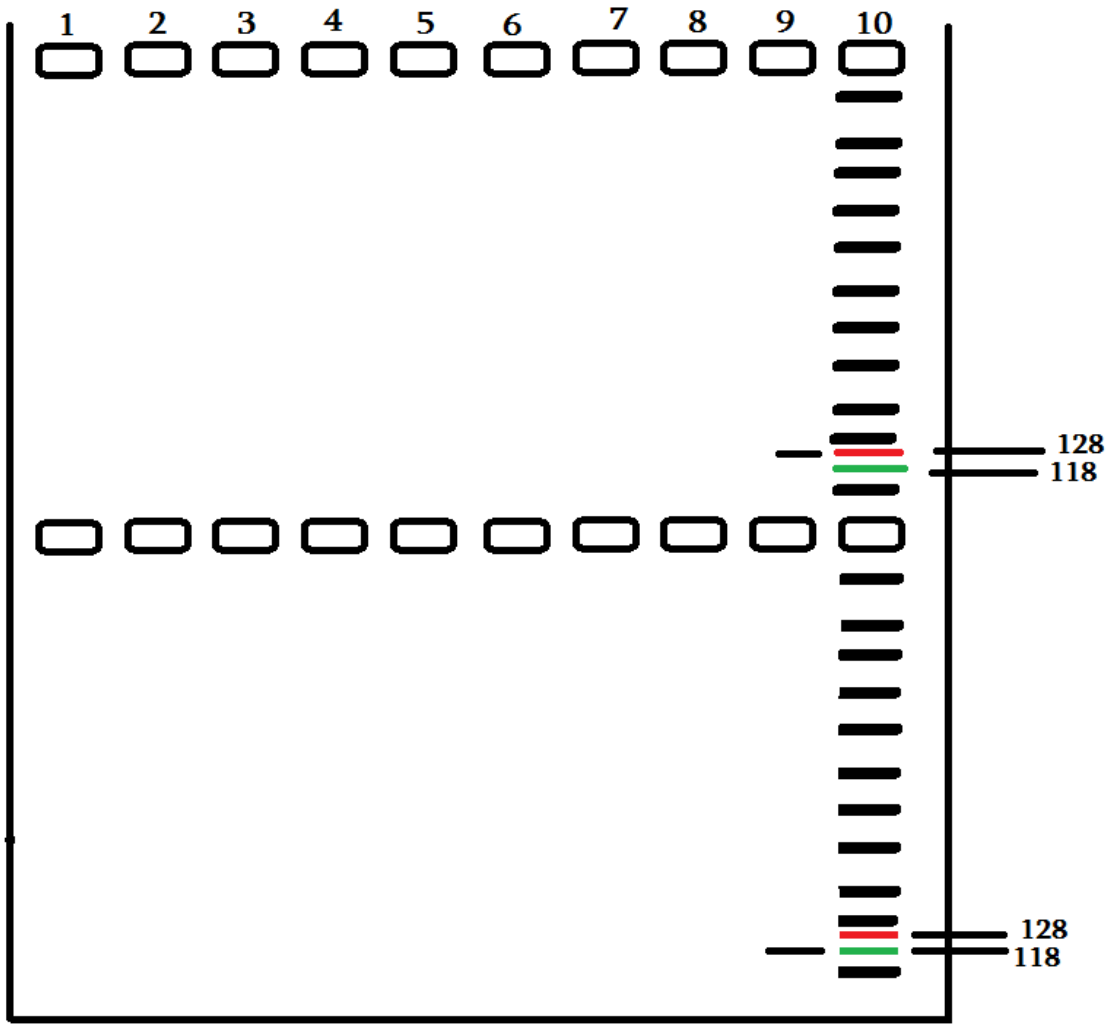
ფოტო3. ცხოველთა პოტენციური სუბპროდუქდებიდან ექსტრაგირებული დნმ-ს პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტების ელექტროფორეზის შედეგები.

3.4 InstaGene'' ხელატორული მიკრო ნაწილაკებით ღვიძლიდან ექსტრაგირებული დნმ-ის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია

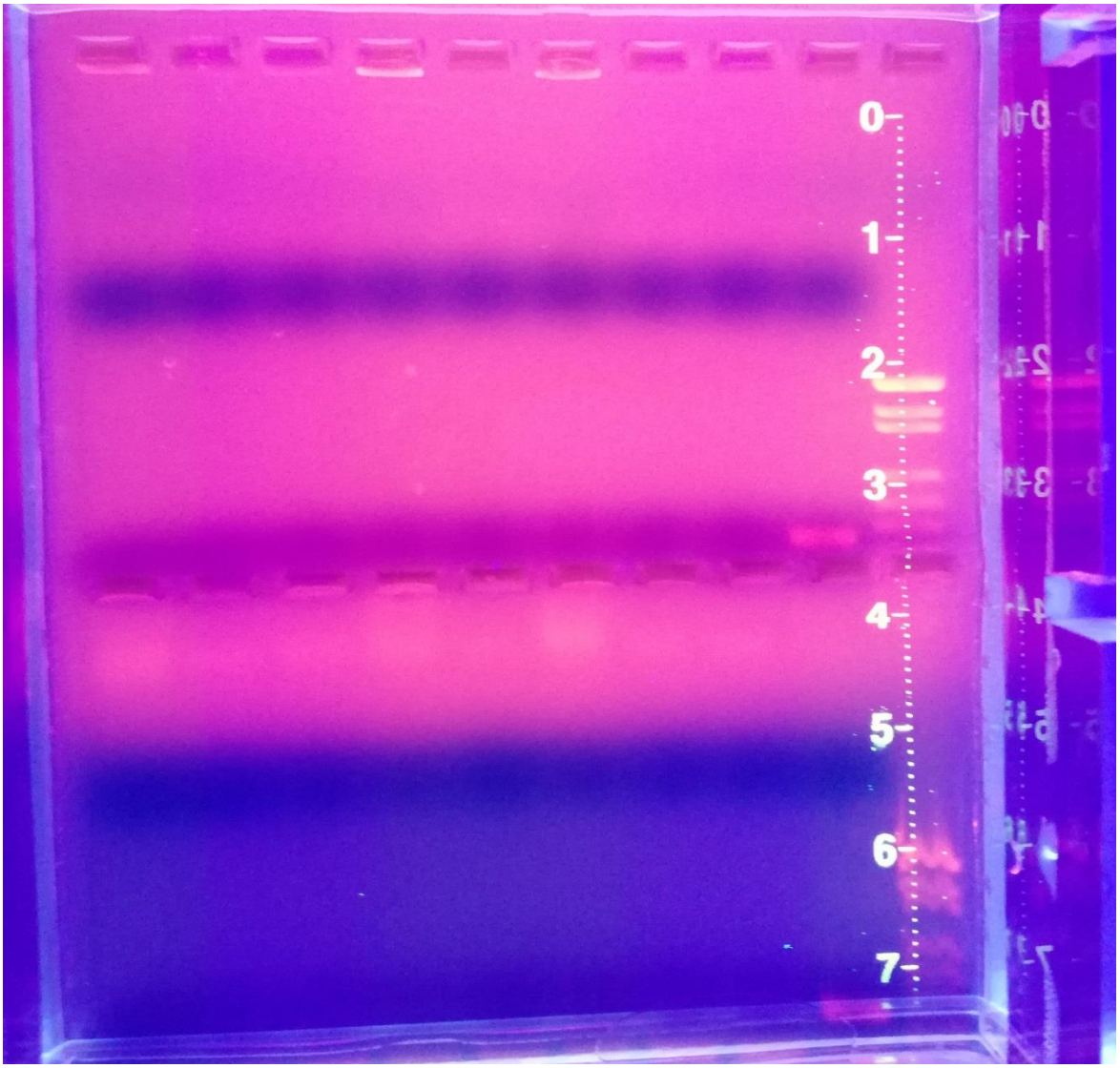
პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის შედეგად მოვახდინეთ ამპლიფიცირება **InstaGene'' ხელატორული მიკრო ნაწილაკებით** ექსტრაგირებული დნმ-ის. მიღებულ ამპლიკონებს დავუმატეთ სპეციალური საღებავი - "Loading dye". საკვლევ ობიექტს წარმოადგენა საკონტროლო და საცდელის ჯგუფების ღვიძლიდან ექტრაგირებული დნმ. მათი შეტანა გელის ფოსოებში მოვახდინეთ ცხრილი 6-ის მიხედვით. ნიმუშების შევღებეთ ეთიდიუმბრომიდის მეშვეობით, რის შემდეგაც მოვახდინეთ მათი გაშუქება ტრანსილუმინატორზე. გამოკვლეული ნიმუშებიდან არცერთმა მათგანმა მოგვცა ნათება როგორც გმოს ასევე სოიოს ლექტინის არეში. (იხილეთ ფოტო 4)

Rounup Ready Soybean Gmo მარკერი		Rounup Ready Soybean ლექტინის მარკერი	
1	ღვიძლი	1	ღვიძლი
2	ღვიძლი	2	ღვიძლი
3	ღვიძლი	3	ღვიძლი
4	ღვიძლი	4	ღვიძლი
5	ღვიძლი	5	ღვიძლი
6	ღვიძლი	6	ღვიძლი
7	ღვიძლი	7	ღვიძლი
8	ღვიძლი	8	ღვიძლი
9	დადებითი კონტროლი	9	დადებითი კონტროლი
10	მოლეკულური სახაზავი	10	მოლეკულური სახაზავი

ცხრილი13. ელექტროფორეზის გელის ფოსოებში მოთავსებული ნიმუშები



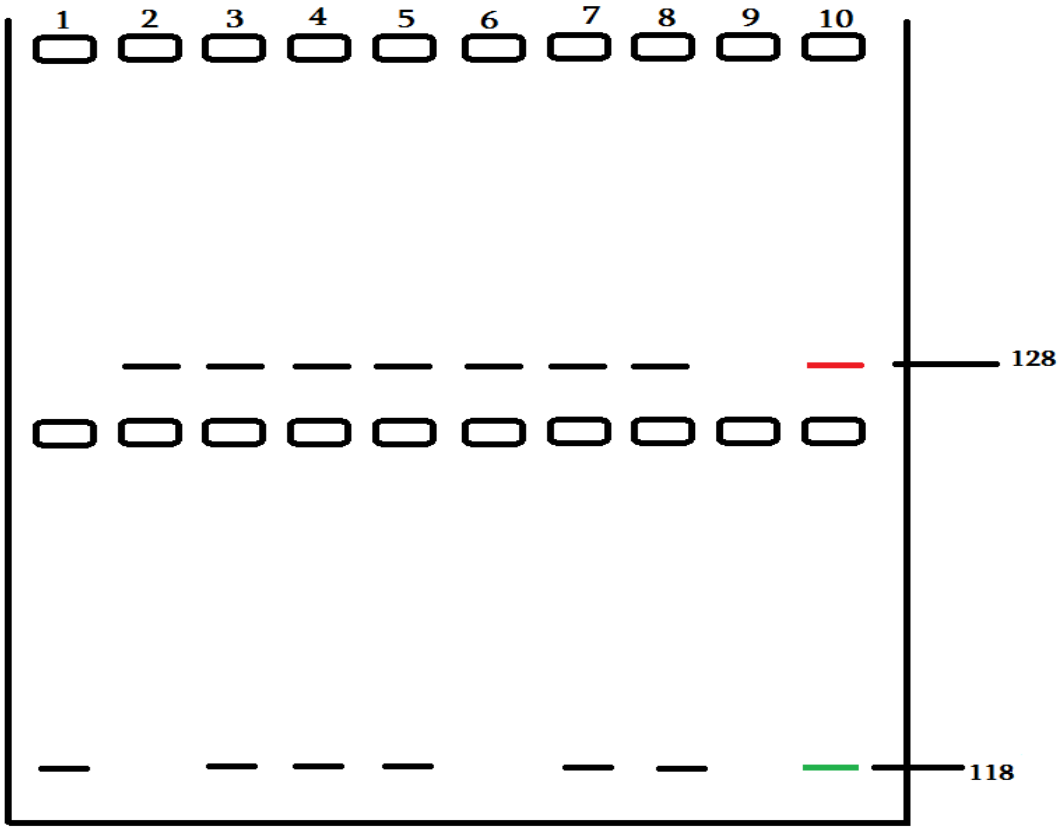
სქემა 5. PCR პროდუქტების გელ ელექტროფორეზის შედეგის ბლოკ სქემა.



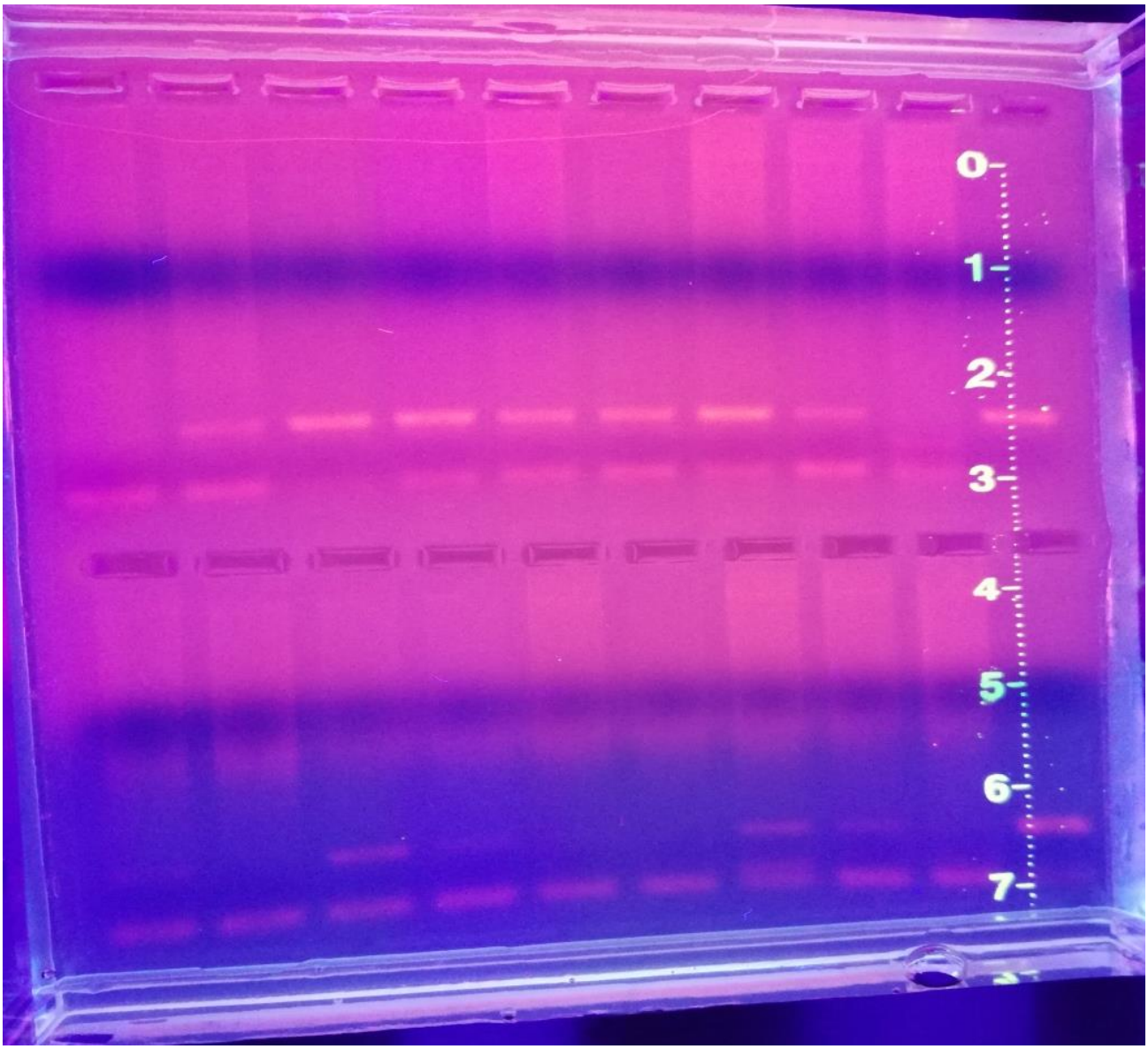
ფოტო 4. ცხოველთა პოტენციური სუბპროდუქტიდან - ღვიძლიდან ექსტრაგირებული დნმ-ს პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტების ელექტროფორეზის შედეგები

3.5 „Spin Column" მინი სვეტებით ექსტრაგირებული დნმ-ის პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის შედეგად მოვახდინეთ ამპლიფიცირება **„Spin Column" მინი სვეტებით** ექსტრაგირებული დნმ-ის. მიღებულ ამპლიკონებს დავუმატეთ სპეციალური საღებავი - "Loading dye". საკვლევ ობიექტს წარმოადგენა საკონტროლო და საცდელის ჯგუფების ორგანოებიდან (პოტენციური სუბროდუქტებიდან) ექტრაგირებული დნმ. მათი შეტანა გელის ფოსოებში მოვახდინეთ ცხრილი 5-ის მიხედვით. ნიმუშების შევღებეთ ეთიდიუმბრომიდის მეშვეობით, რის შემდეგაც მოვახდინეთ მათი გაშუქება ტრანსილუმინატორზე, რის შედეგადაც მივიღეთ ნათება გმოს არეში აღებული ნიმუშებიდან შვიდ მათგანში, ხოლო სოიოს ლექტინის არის შემთხვევაში კი მივიღეთ ექვსი ნათება. (იხილეთ ფოტო 5)



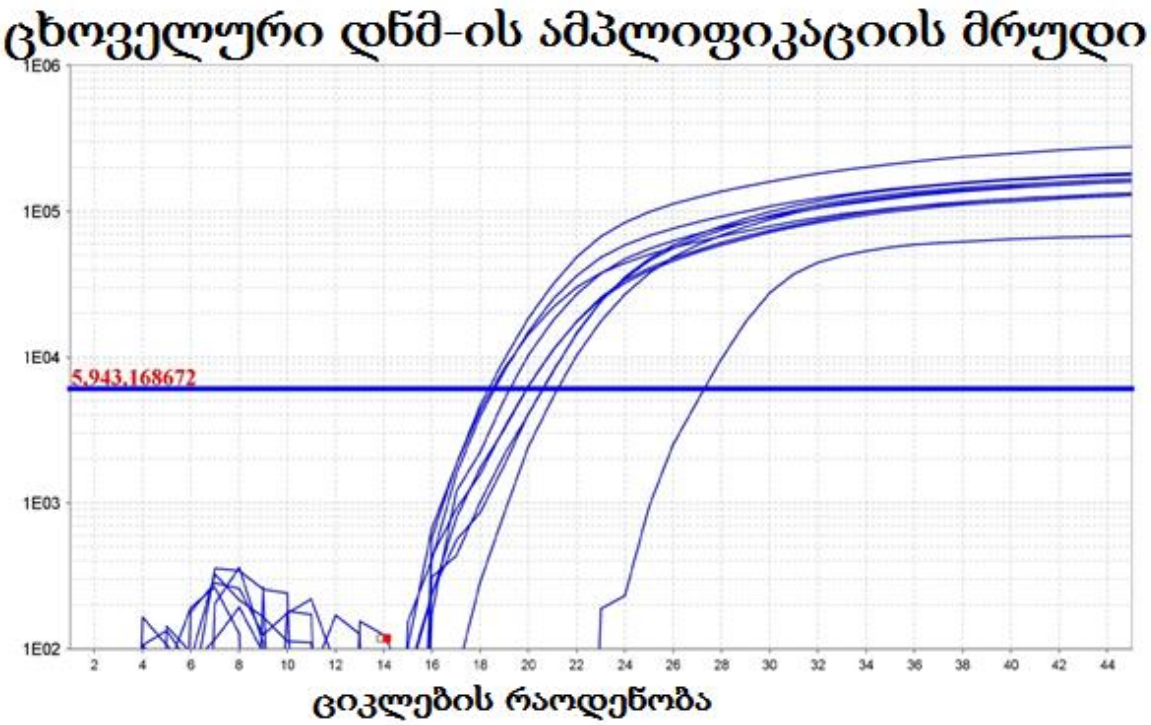
სქემა6. PCR პროდუქტების გელ ელექტროფორეზის შედეგის ბლოკ სქემა.



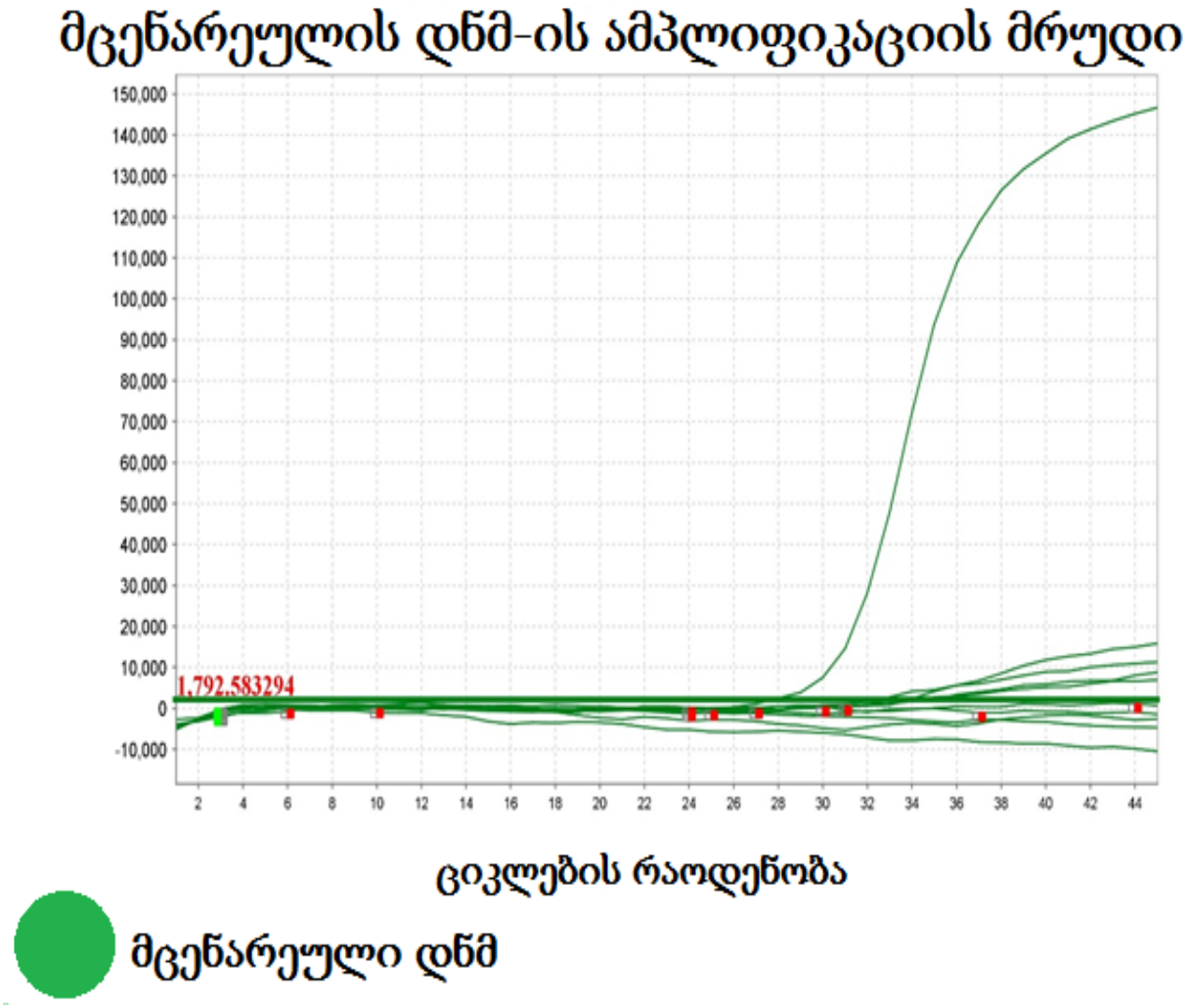
ფოტო5. ცხოველთა პოტენციური სუბპროდუქდებიდან ექსტრაგირებული დნმ-ს პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის პროდუქტების ელექტროფორეზის შედეგები.

3.6 მცენარეული და ცხოველური დნმ-ის პოლიმერაზური ჯაჭვური რეაქცია

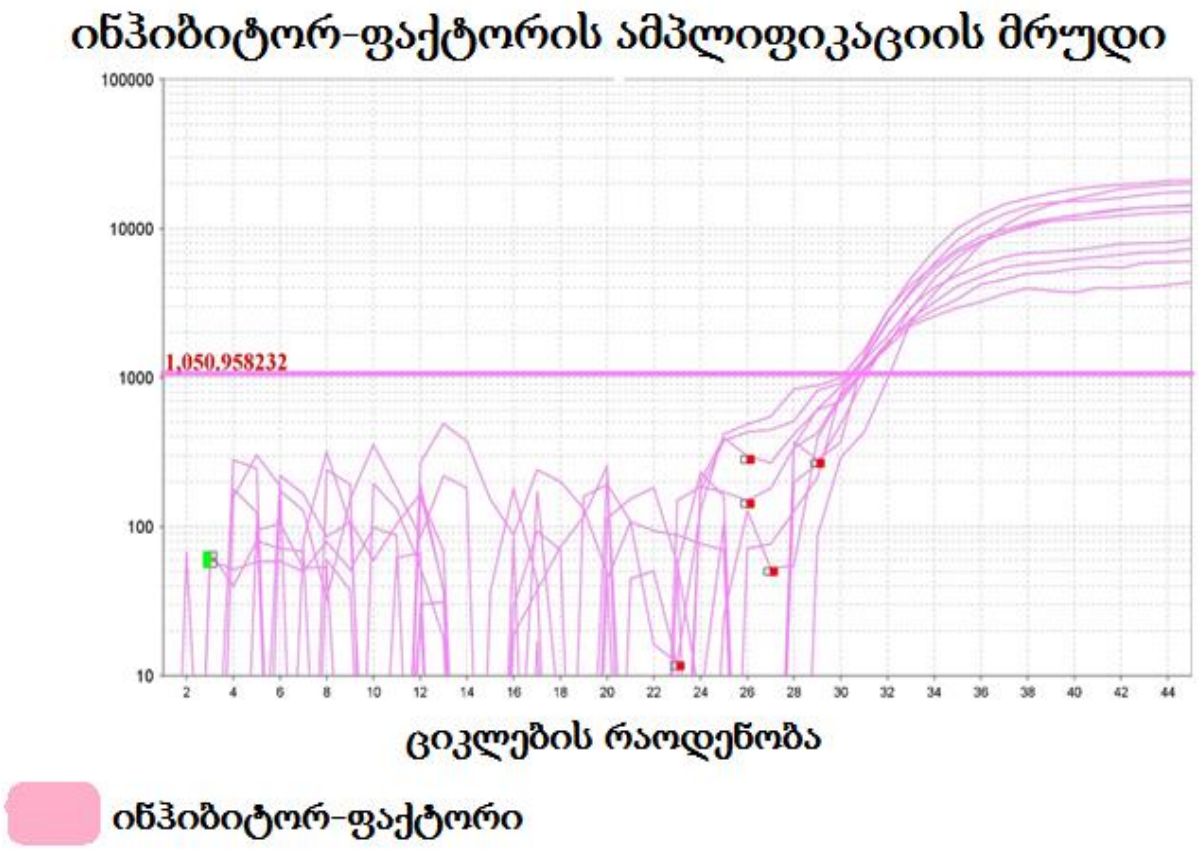
პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროშის მეშვეობით შევამოწმეთ თუ რამდენად სწორად მოვახდინეთ გამოყოფა ცხოველური დნმ. ასევე გადავამოწმეთ მოხდა თუ არა ჩვენი საკვლევი ნიმუშების კონტამინაცია ფრინველის გენმოდიფიცირებული საკვების მეშვეობით. როგორც სქემა 7-8 გვიჩვენებს, გამოყოფილია ცხოველური დნმ, რომელიც არაა დაბინძურებული გენმოდიფიცირებული საკვებით. ასევე შევამოწმეთ პჯრ-ს მაინჰიბირებელი კომპონენტის არსებობა გამოყოფილ ნიმუშებში. (სქემა 9)



სქემა7. საკვლევი ნიმუშებიდან გამოყოფილი დნმ-ის კვლევა ცხოველურ დნმ-ზე



სქემა8. საკვლევი ნიმუშებიდან გამოყოფილი დნმ-ის მცენარეულ დნმ-ზე.



სქემა 9. საკვლევი ნიმუშებიდან გამოყოფილი დნმ-ის კვლევა ინფიბიტორ ფაქტორებზე.

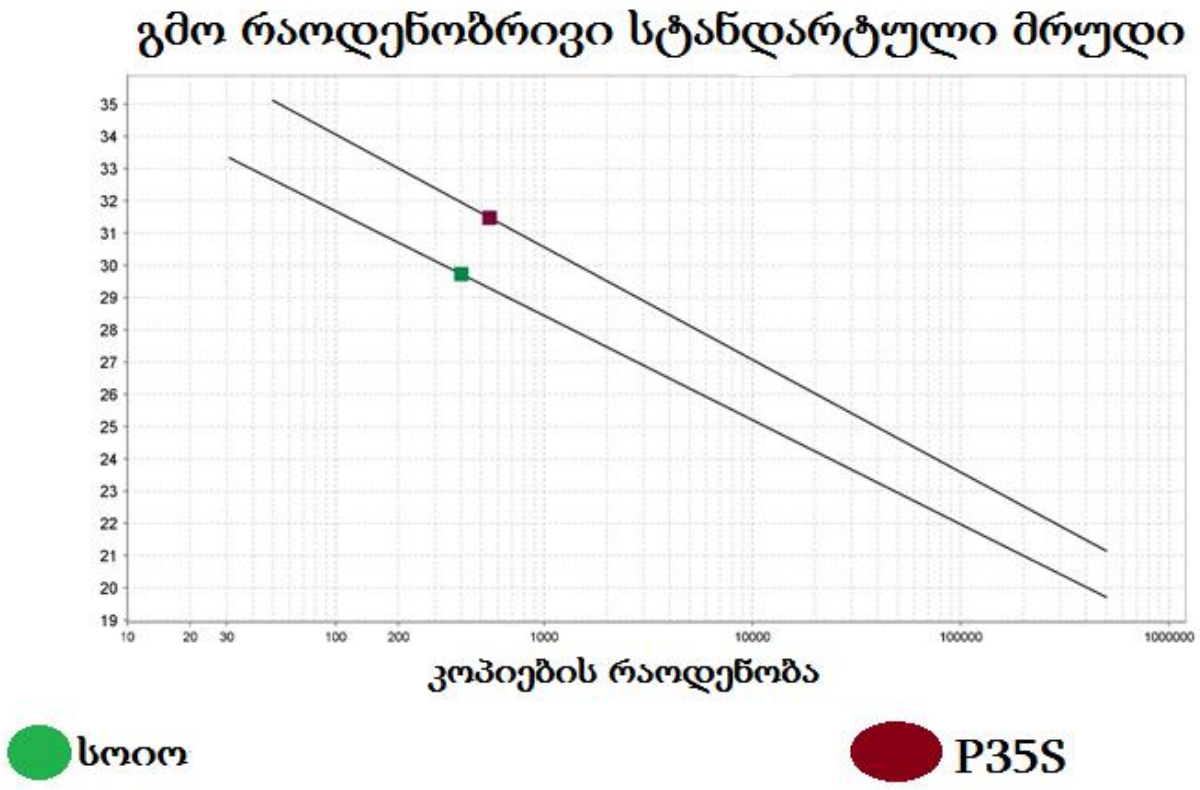
3.7 ფრინველის საკვების გმო რაოდენობრივი ანალიზი - პჯრ რეალურ დროში

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროშის მეშვეობით დავადგინეთ საცდელი ჯგუფისთვის განკუთვნილ საკვებ პრემიქსში გენმოდიფირებული სოიოს რაოდენობა. რაოდენობრივი ანალიზის შედეგად დადგინდა, პრემიქსი შეიცავს 85% გენმოდიფიცირებულ სოიოს. იხ. სქემა 10-11

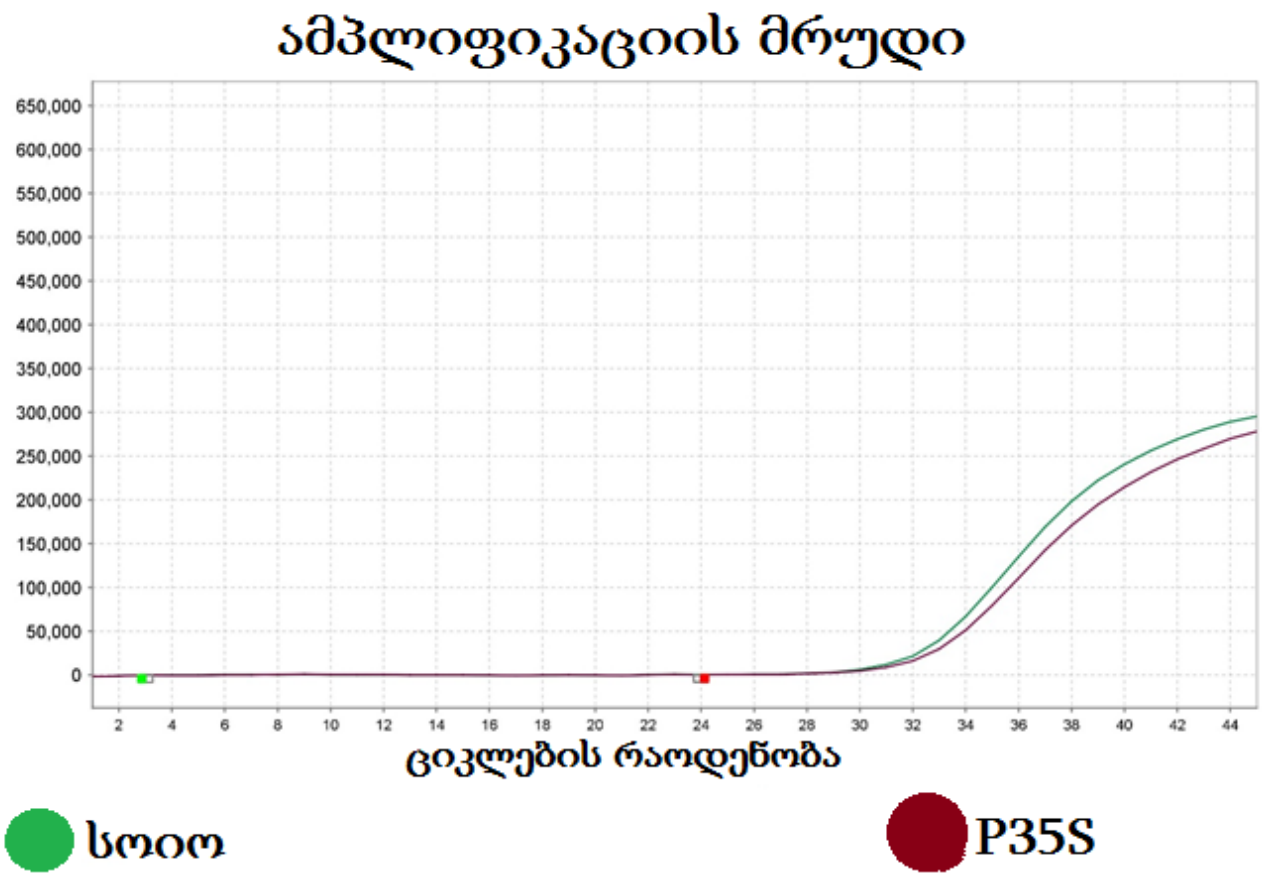
კონტ= 3486,74 ÷ 218249.422 * 100 = 1.6

K= 1 ÷ 6 = 0.625

ნიმუში = 546.858 ÷ 400.486 * 100 * 0.625 = 85 %



სქემა 10. გმო რაოდენობრივი ანალიზის სტანდარტული მრუდი



სქემა 11. გმო რაოდენობრივი ანალიზის ამპლიფიკაციის მრუდი

ჩვენ მიერ, ორი წლის განმავლობაში ჩატარებული კვლევებით მივიღეთ, რომ ბროილერის ჯიშის ქათმის არცერთ ღვიძლში არ მოხდა გადასვლა Roundup Ready Soybeans-ის გენსპეციფიკური კონსტრუქციისა, ხოლო კუჭისა და კუნთის შემთხვევაში დაფიქსირდა, როგორც Roundup Ready Soybeans-ის გენსპეციფიკური გმო მარკერის, ასევე ლექტინის არსებობა. შედეგები წარმოდგენილია ცხრილი 10- ის სახით.

ორგანოები	კონტროლი (20 ერთეული)		საცდელი (30 ერთეული)	
	გმო	ლექტინი	გმო	ლექტინი
კუჭი	0	0	5	3
ღვიძლი	0	0	0	0
კუნთი	0	0	7	3

ცხრილი 14. საკონტროლო და საცდელი ჯგუფის Roundup Ready Soybeans გმო მარკერებზე კვლევის ჯამური შედეგი.

დასკვნა

- ბროილერის ჯიშის ქათმის საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში არ ხდება რეკომბინანტული დნმ-ის გმო კონსტრუქციის მარეგულირებელი უბნების სრული დეგრადაცია
- ნაწილობრივ მიმდინარეობს **Roundup Ready Soybeans** -ის გენსპეციფიკური კონსტრუქციის ჰორიზონტალური ტრანსფერი ბროილერის ჯიშის ქათმის ზოგიერთ ორგანოში

გამოყენებული ლიტერატურა

1. საქართველოს კანონი ცოცხალი გენმოდიფიცირებული ორგანიზმების შესახებ

2 M. K. Sateesh (25 August 2008). Bioethics and Biosafety. I. K. International *Pvt Ltd. pp. 456–*. ISBN 978-81-906757-0-3. Retrieved 27 March 2013

3. ივანე ჯავახიშვილის დაბადებიდან 140 წლის იუბილესადმი მიძღვნილი სსიპ-ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის სტუდენტთა 76-ე საუნივერსიტეტო სამეცნიერო კონფერენცია. თემა: "ცხოველის გენმოდიფიცირებული საკვების დნმ-ს დეგრადაციის შესწავლა ბროილერის ჯიშის საჭმლის მომნელებელ სისტემაში", თბილისი 2016 წ.;

4. Dr. Jacquie Jacob(2015). Avian Digestive System- University of Kentucky

5. Bertolla F. and Simonet P. (1999) Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a
putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. Res. Microbiol. 150: 75-384.

6. Nielsen K. M., Bones A. M., Smalla K. and van Elsas J.D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria – a rare event? FEMS Microbiology Reviews. 22 (2):79-103.

7. Gebhard F. and Smalla K. (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. FEMS Microbiology Ecology 28(3): 261-272.

8. Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C, Nordgrd L, Nielsen KM, Daffonchio D. "The stability and degradation of
dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals: implications for horizontal gene transfer and the biosafety
of GMOs." Crit Rev Food Sci Nutr. 2012;52(2):142-61. doi: 10.1080/10408398.2010.499480.

9. RAINER SCHUBBERT, DORIS RENZ, BIRGIT SCHMITZ, AND WALTER DOERFLER- Medical

10. Rizzi A[1], Raddadi N, Sorlini C, Nordgrd L, Nielsen KM, Daffonchio D. "The stability and degradation of dietary DNA in the gastrointestinal tract of mammals: implications for horizontal gene

transfer and the biosafety of GMOs." Crit Rev Food Sci Nutr. 2012;52(2):142-61. doi: 10.1080/10408398.2010.499480.

11 Ravi Jain, Maria C. Rivera, and James A. Lake*. "Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis" Current Issue > vol. 96 no. 7 > Ravi Jain, 3801–3806, doi: 10.1073/pnas.96.7.3801

12. http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html

13. Kay E[1], Vogel TM, Bertolla F, Nalin R, Simonet P." In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria." Appl Environ Microbiol. 2002 Jul;68(7):3345-51.

14. მარიამ გაიდამაშვილი, ავთანდილ კორახაშვილი- "აგრობიოტექნოლოიები" (თბილისი 2012წ)

15. დავით ძნელაძე ("ბიოტექნოლოგიის კვლევის თანამედროვე აპარატურა და მეთოდები" – (თბილისი 2011 წ)