

Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (ZRGSO)

- sprejet 11.7.2002 (Ur. list 67/2002); Zakon o spremembah Zakona 17.6.2004, 12.3.2010
- zakon ureja ravnanje z GSO, določa ukrepe za preprečevanje/zmanjševanje možnih škodljivih vplivov na okolje in na zdravje ljudi, ureja uvoz/izvoz GSO in izdelkov.
- Določbe zakona ne veljajo za: prevoz GSO; za zdravila, ki vsebujejo GSO; za živila in krmo, ki vsebujejo GSO.

Načela zakona:

- celovitost obravnavanja ravnanja z GSO
- delo z GSO je dovoljeno le, če ni škodljivo za okolje in ljudi
- bioetičnost pri ravnanju z GSO
- dovoljenja v zvezi z GSO izdajajo po presoji vsakega primera posebej
- sproščanje GSO v okolje je dovoljeno le postopno
- pri izdelkih na trgu je treba zagotoviti sledljivost
- v primeru nastale škode zaradi GSO je zanjo odgovoren, kdor izvaja delo z GSO, sprošča GSO ali daje izdelke na trg - ti tudi krijejo stroške ukrepov za zagotavljanje varnosti
- država mora ukrepati v primerih, ko povzročitelj ni določljiv ali če je to edini način za odpravo posledic
- javnost ima pravico biti obveščena o ravnanju z GSO in biti vključena v postopke dovoljevanja

Zakon o ravnanju z GSO /

2

- Splošne določbe
 - Delo z GSO v zaprtem sistemu
 - Namerno sproščanje GSO v okolje
 - Dajanje izdelka na trg
 - Uvoz in izvoz GSO in izdelkov
 - Register GSO
 - Nadzor
 - Kazenske določbe
 - Prehodne in končne določbe
-
- Vlada RS ustanovi komisijo za ravnanje s GSO za spremljanje stanja in razvoja ravnanja z GSO (17 članov: 9 iz znanosti, 2 iz zn. odborov, 4 iz nevladnih organizacij, 2 iz zbornic)
 - Vlada za pomoč ministrstvu ustanovi 2 znanstvena odbora: za delo z GSO v zaprtih sistemih / za sproščanje v okolje in dajanje na trg (po 7 članov, predlaga MŠZŠ)
 - Delo v zaprtem sistemu: 4 varnostni razredi
 - Zaprti sistem je treba prijaviti ministrstvu pred prvo uporabo za delo z GSO: ministrstvo pridobi strokovno mnenje (30 dni) in vpiše sistem v register GSO v 60 dneh od pridobitve prijave
 - Prijavitelj mora 'zagotoviti izdelavo' ocene tveganja nameravanega dela: ovrednotiti možne škodljive vplive, raven tveganja, potrebne ukrepe - temelj za uvrstitev v varnostne razrede.

Zakon o ravnanju z GSO /3

- Prijavitelj mora oceno tveganja vsakoletno pregledovati in dopolnjevati, če je to potrebno.
- Prijavitelj mora pred začetkom dela 'zagotoviti izdelavo' načrta ukrepov za primer nesreče.
- Prijavitelj lahko v prijavi navede podatke, ki so poslovna skrivnost.
- Javnost ima vpogled in lahko daje pripombe v postopkih za izdajo dovoljenja za delo z GSO iz 3. in 4. razreda.
- Delo z GSO iz 1. razreda se lahko začne brez prijave, če se izvaja v zaprtem sistemu, vpisanem v register; ocena tveganja mora biti na voljo.
- Delo z GSO iz 2. razreda se lahko začne 45 dni po vložitvi prijave, če v tem času ni izrecno prepovedano.
- O nesrečah je treba obvestiti pristojno ministrstvo, to pa obvesti Center za obveščanje RS. O ukrepih in njihovi uspešnosti ministrstvo pripravi poročilo, ki ga sprejme vlada in z njim obvesti javnost.
- Za namerno sproščanje GSO v okolje mora prijavitelj pridobiti dovoljenje ob soglasju ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Za trženje je potrebno posebno dovoljenje.
- Zahtevana je ocena tveganja, načrt ukrepov v primeru nepričakovanega širjenja. Določena so pravila glede zaupnosti podatkov.

Zakon o ravnanju z GSO /4

- Za dajanje novega izdelka na trg je potrebno pridobiti dovoljenje ministrstva, pristojnega za varstvo okolja (ob soglasju Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano).
- Prijavitelj mora 'zagotoviti izdelavo' ocene tveganja, ki ga predstavlja nameravano dajanje izdelka na trg.
- Ministrstvo (po pridobitvi mnenja odbora in drugih ministrstev) pripravi poročilo o primernosti izdelka v 60 dneh. V 105 dneh ministrstvo odloči o dovoljenju za dajanje na trg.
- Dovoljenje velja največ 10 let z možnostjo podaljšanja. O dovoljenju ali njegovi zavrnitvi je treba obvestiti javnost preko ministrstva, pristojnega za varstvo potrošnikov.
- Prijavitelj mora zagotoviti monitoring vplivov izdelka in njegove uporabe na okolje in zdravje ljudi in o rezultatih redno poročati ministrstvu. Ti podatki so javni.
- Izdelek mora imeti na embalaži ali v deklaraciji navedene tudi podatke o tem, da vsebuje ali je sestavljen iz GSO; na vidnem mestu mora pisati: "Ta izdelek vsebuje gensko spremenjeni organizem".
- Register GSO sestavljajo evidence o zaprtih sistemih, delih z GSO v zaprtih sistemih, namernem sproščanju GSO v okolje in dajanju izdelkov na trg. Register je javno dostopen.

Podzakonski akti

- Uredba Vlade RS o načinu delovanja znanstvenih odborov na področju ravnanja z gensko spremenjenimi organizmi (Ur. list RS 66/2003)
- Uredba Vlade RS o merilih za uvrstitev dela z GSO v zaprtem sistemu v varnostni razred in zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepih za posamezni varnostni razred (Ur. list RS 33/2004)
- Navodila za izvajanje Uredbe o merilih za uvrstitev del z GSO v zaprtem sistemu v varnostni razred in zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepih (MOPE, april 2004)
- Pravilnik ministra za OPE o oceni tveganja za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu (Ur. list RS 45/2004)
- Pravilnik ministra za OPE o vsebini prijave zaprtega sistema in prijave dela z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu (2.6.2004)
- Pravilnik o vsebini prijave namernega sproščanja gensko spremenjenih organizmov v okolje (25.4.2005)
- Pravilnik o postopku za določitev predstavnikov nevladnih organizacij v Komisiji za ravnanje z gensko spremenjenimi organizmi (25.4.2005)
- Pravilnik o načrtu ukrepov za primer nesreče pri delu z GSO v zaprtem sistemu (22.7.2005)

Prijava zaprtega sistema

Priloga I Pravilnika o vsebini prijave zaprtega sistema in prijave dela z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu

- Prijavitelj
- Odgovorna oseba prijavitelja
- Pooblaščenec za biološko varnost
- Oseba, odgovorna za nadzor in varnost
- Odbor za varnost pri delu z GSO
- Mnenje odbora o zadrževalnih ukrepih in razpoložljivi opremi
- Naslov in lokacija zaprtega sistema
- Vrsta zaprtega sistema (laboratorij, bioreaktor, rastlinjak, proizv. enota)
- Podatki o varnostnem razredu nameravanih del z GSO
- Področje dela (virologija, bakteriologija, transgenske rastline, ...)
- Utemeljitev določitve podatkov, ki naj se varujejo kot zaupni
- Izjava o resničnosti in točnosti podatkov.
- Priloge: načrt prostorov, podatki o delu z GSO, dokazilo o registraciji dejavnosti prijavitelja

Podatki o delu z GSO iz 1. varnostnega razreda

Priloga II Pravilnika o vsebini prijave zaprtega sistema in prijave dela z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu

- Prijavitelj
- Odgovorna oseba prijavitelja
- Vrsta zaprtega sistema (laboratorij, bioreaktor, rastlinjak, proizv. enota)
- Področje dela (virologija, bakteriologija, transgenske rastline, ...)
- Splošne značilnosti organizmov in uvrstitev na sezname varnih organizmov: izvorni organizem, prejemni organizem, vključek, vektor, namen dela in pričakovani rezultati, izjava o morebitnem uvozu organizma (v skladu s Kartegenskim protokolom)
- Vodja projekta
- Mnenje odbora za varnost pri delu z GSO o oceni tveganja
- Opis zadrževalnih ukrepov in opreme za njihovo zagotavljanje
- Ravnanje z odpadki (nastajanje, značilnosti, obdelava, odstranjevanje)
- Ukrepi za primer nesreče
- Utemeljitev določitve podatkov, ki naj se varujejo kot zaupni
- Izjava o resničnosti in točnosti podatkov.

Varnost

Priloga I Uredbe o merilih za uvrstitev dela z gGSO v zaprtem sistemu v varnostni razred in zadrževalnih in drugih varnostnih ukrepih za posamezni varnostni razred (Ur. list RS 33/2004).

Tehnične zahteve		Zadrževalne stopnje			
		1	2	3	4
1	laboratorijski oddelek: izolacija ²	ni obvezno	ni obvezno	obvezno	obvezno
2	možnost zatesnitve laboratorija ob zaplinjenju	ni obvezno	ni obvezno	obvezno	obvezno

oprema

3	površine, ki so odporne na vodo, kisline, baze, topila, razkužila, sredstva za dekontaminacijo in se jih lahko čisti	obvezno (delovne površine)	obvezno (delovne površine)	obvezno (delovne površine, tla)	obvezno (delovne površine, tla, stene in strop)
4	vstop v laboratorij skozi zračno komoro ³	ni obvezno	ni obvezno	po izbiri	obvezno
5	podtlak glede na tlak v neposrednem okolju	ni obvezno	ni obvezno	obvezno razen za ⁴	obvezno
6	izpust in dovod zraka v laboratorij, naj bosta skozi filter HEPA ⁵	ni obvezno	ni obvezno	obvezno HEPA - odvod zraka razen za ³	obvezno ⁶ HEPA - izpust in dovod zraka
7	delovno mesto osebe, odgovorne za biološko varnost*	ni obvezno	po izbiri	obvezno	obvezno
8	avtoklav	na isti lokaciji, kot je laboratorij (on site)	v stavbi	na oddelku ⁷	v laboratoriju = avtoklav – z enosmernim pretokom materiala (double ended)

Sistem dela

9	Omejen dostop	ni obvezno	obvezno	obvezno	obvezno
---	---------------	------------	---------	---------	---------

² izolacija: laboratorij je ločen od ostalih prostorov v isti stavbi oz. je v ločeni stavbi

³ zračna komora: obvezen vstop skozi zračno komoro, ki je od laboratorija izoliran prostor. Čista stran zračne komore mora biti ločena od strani, za katero veljajo omejevalni ukrepi s prostori za preoblačenje in prhanje in po možnosti z vrati, ki se neprodušno zapirajo

⁴ dejavnosti, pri katerih ne pride do prenosa preko zraka

⁵ HEPA "High Efficiency Particulate Air" - sistem za zelo učinkovito zadrževanje delcev

⁶ če se uporabljajo virusi, ki jih HEPA filtri ne zadržijo, so za odvajanje zraka potrebne posebne zahteve

⁷ Z validiranimi postopki, ki omogočajo varen prenos materiala v avtoklav zunaj laboratorija in zagotavljajo enakovredno stopnjo zaščite.

* samo za delo z gensko spremenjenimi mikroorganizmi

Varnost /2

(nadaljevanje)

Posebej so definirani zadrževalni ukrepi za delo z GSO v rastni komori ali rastlinjaku, za delo z GSO v enoti za delo z živalmi in delo z GSO v namensko opremljenem laboratoriju z bioreaktorjem.



10	znak za biološko nevarnost na vratih	ni obvezno	obvezno	obvezno	obvezno
11	Posebni ukrepi za nadzor nad razširjanjem aerosolov	ni obvezno	obvezno - minimizirati	obvezno - preprečiti	obvezno - preprečiti
12	Prha	ni obvezno	ni obvezno	po izbiri	Obvezno in opraviti dekontaminacijo
13	Zaščitna obleka	primerna zaščitna obleka	primerna zaščitna obleka in (po izbiri) obutev	primerna zaščitna obleka in obutev	pred vstopom in izstopom zamenjati vso obleko in obutev in opraviti dekontaminacijo
14	Rokavice	ni obvezno	po izbiri	obvezno	obvezno
15	Učinkovit nadzor nad vektorji (npr. glodalci in žuželke)	po izbiri	obvezno	obvezno	obvezno

odpadki

16	Inaktivacija GSO v vsem materialu in odpadkih, ki so GSO ali so prišli v stik z GSO	po izbiri	obvezno	obvezno	obvezno
17	Ustrezno odstranjevanje odplak iz umivalnikov in prh ter v podobnih odplakah	ni obvezno	po izbiri	obvezno	obvezno

Drugi ukrepi

18	Laboratorij mora imeti svojo opremo	ni obvezno	ni obvezno	obvezno	obvezno
19	Opazovalno okno ali druga rešitev, ki omogoča opazovanje ljudi v laboratoriju	po izbiri	po izbiri	po izbiri	obvezno

Smernice NIH za raziskovanje, ki vključuje rekombinantne molekule DNA

- 1973-74: ZDA – razprave in pozivi k moratoriju na poskuse z rDNA
- 1975: Asilomarska konferenca: z večino dela lahko nadaljujejo, a ob upoštevanju zaščitnih ukrepov
- 1. verzija 'Smernic NIH' izšla junija 1976, zadnja verzija 1994, dopolnila so izhajala skoraj vsako leto do 2002, zadnje 2009 (uskladitev z drugimi navodili in delo z virusi influence)
- določila obvezna za vse raziskave, ki jih (so)financira NIH, tudi v tujini (če ni ustrezne lastne zakonodaje)
- izdaja svetovalni odbor NIH za rekombinatno DNA (RAC)
- Smernice imajo 5 delov (25 strani) in 15 prilog (navodila in izjeme: ~90 strani)
- Neupoštevanje Smernic ima za posledico zmanjšanje ali ukinitvev sofinanciranja projekta (in drugih podobnih projektov na instituciji) ali obvezno odobravanje vseh nadaljnjih projektov (z rekombinantno DNA) na tej instituciji.

- 1. del: definicije in namen
- 2. del: skupine tveganja (RG1-4), ocena tveganja, načini zapiranja (fizikalni in biološki pristop)
- 3. del: vrste poskusov, ki jih Smernice pokrivajo
- 4. del: naloge in odgovornosti (institucije in NIH)
- 5. del: opombe in literatura

Smernice NIH (2)

določila za 1. varnostni razred

Strogo upoštevamo 'standardne mikrobiološke prakse':

- Vstop v laboratorij lahko omeji vodja projekta.
- Delovni pult razkužimo 1x dnevno in po vsakršnem razlitju živih celic.
- Vse okužene tekočine ali trdne odpadke moramo razkužiti preden jih zavržemo.
- Za pipetiranje uporabljamo naprave; pipetiranje z usti je prepovedano.
- V območju dela je prepovedano jesti, piti, kaditi in se ličiti. Hrano smemo hraniti samo v omarah ali hladilnikih, ki so namenjeni posebej za to.
- Roke si je treba umiti: 1) po tem, ko smo delali z materialom, ki je v zvezi z organizmi, ki vsebujejo rekombinantno DNA in živalmi; 2) preden zapustimo laboratorij.
- Vse postopke izvajamo previdno, da zmanjšamo nastajanje aerosolov.
- Zagotovljeni morajo biti oprema (umivalniki, tuši, garderobe) in zaščitna oblačila, ki so primerni tveganju izpostavljenosti živemu organizmu, ki vsebuje rekombinantno DNA.

Smernice NIH (3)

določila za 1. varnostni razred

Posebna pravila:

- Če material dekontaminiramo izven laboratorija, ga moramo postaviti v trajne neprepustne posode, ki jih zapremo, preden zapustijo laboratorij.
- Izvajamo program zatiranja glodavcev in žuželk.

Laboratorij:

- Laboratorij mora biti urejen tako, da ga je enostavno čistiti.
- Pulti morajo biti neprepustni za vodo in odporni na kisline, baze, organska topila in zmerno vročino.
- Pohištvo mora biti čvrsto. Prostori med pulti, omarami in opremo morajo biti dostopni za čiščenje.
- Vsak laboratorij mora imeti umivalnik.
- Če ima laboratorij okna, ki se odpirajo, morajo biti zaščitena z mrežami proti žuželkam.

Kriteriji za izbor laboratorijskega organizma

- ali nas zanima **določena vrsta organizma**?
(npr. regulacija celičnega ciklusa pri kvasovkah → ta organizem)
- ali bomo delali **le z nukleinskimi kislinami**? → bakterije
- ali nas zanimajo **interakcije med makromolekulami** → predstavitev na fagih; Y2H
- ali bomo **proizvedli tudi proteine**?
 - morajo biti proteini **glikozilirani** (ipd.)? → ne bakterije
 - morajo biti proteini **pravilno glikozilirani**? → ne kvasovke
 - moramo pridobiti **večje količine** proteinov?
 - si lahko privoščimo kupovanje **dragih gojišč**?
 - bomo morali razviti postopek za **fermentacijo**?
 - imamo **posebne zahteve** za gojenje (temperatura, soli...)?

Ko se odločimo za tip organizma, preverimo:

- so dostopni vektorji, kompleti reagentov, postopki za transformacijo,... za ta sistem?
- nas omejujejo patenti in če, do katere mere?

V praksi delo vsaj v nekaterih stopnjah poteka v bakterijskih celicah:

Prokarionti:

- enocelični organizmi; majhni (0,3 μm - 2 mm)
- brez jedra (samo krožni kromosom(i))
- brez organelov z membrano
- manj DNA
- celična stena

Eukarionti:

- eno- ali večcelični organizmi (1 celica: 2 μm - 20 mm)
- imajo jedro (več kromosomov, DNA s histoni)
- imajo organele z membrano

Najpogosteje uporabljeni organizmi pri delu z rDNA

bakterije:

Escherichia coli, Bacillus subtilis

...

kvasovke:

Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris

...

insektne celice (bakulovirusi):

Spodoptera frugiperda

...

sesalske celice:

COS, HeLa, ...

Escherichia coli

prednosti:

hitra rast

enostavna gojišča (*poceni*)

dobro raziskan organizem (*genom, fiziologija*)

dodelani vektorski sistemi

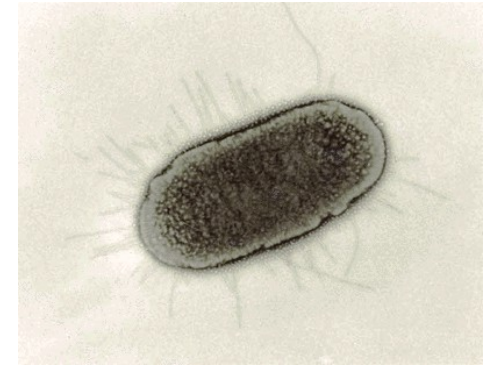
enostavna izolacija vektorske DNA

uveljavljeni postopki dela

slabosti:

ni posttranslacijskih modifikacij

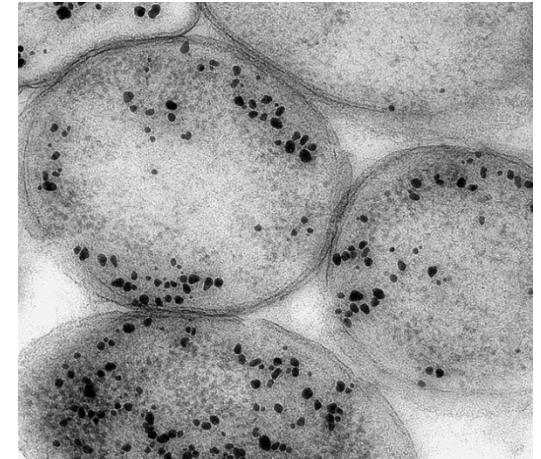
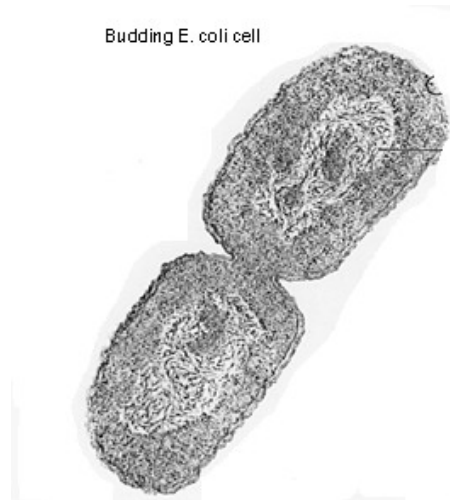
problem nepravilnega zvitja proteinov



Bacillus subtilis

- za lokalizacijo rekomb. proteina v gojišču
- sporulira!
- grampozitivna bakterija; genom 1997

E. coli



- gramnegativna bakterija, ~ 0,5 x 2 μ m
- uporabljamo predvsem seve, izvedene iz seva K-12 (nepatogeni)
- genom obsega ~4200 genov, od tega se jih ~2600 izraža pri normalni rasti v laboratorijskih pogojih
- samo ~350 proteinov je v več kot 100 kopijah/celico
- nukleotidno zaporedje je znano (4,6 Mbp) (Science, 1997)
- celice vsebujejo (po masi) ~55 % proteinov, 20 % nukl. kislin, 9 % lipidov, 3 % lipopolisaharidov

Gojenje *E. coli*

- **Bogata gojišča**

aminokisliline, vitamini, soli, elementi v sledih, vir ogljika
deli se na 22 minut v log. fazi

- **Minimalna gojišča**

ioni (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-}), elementi v sledih, vir ogljika (glukoza)

- Tekoče / trdno gojišče (agar)

- Aerobna / anaerobna rast

- V bogatih gojiščih je običajno omejujoči faktor rasti preskrba s kisikom (stresalnik >200 rpm \rightarrow fermentor)

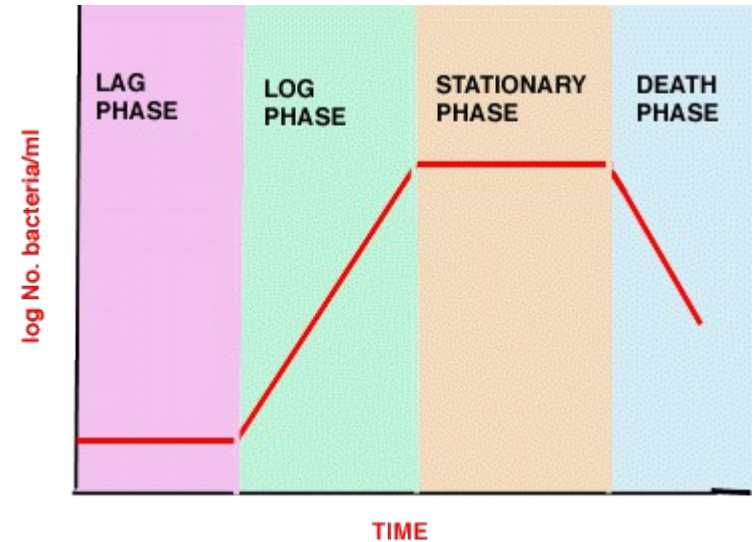
- $37\text{ }^\circ\text{C}$ (preživi med $<10\text{ }^\circ\text{C}$ in $45\text{ }^\circ\text{C}$)

- pH 6 - 7 (preživi v območju pH 4,4 - 9,0)

- v stresalniku dosežejo gostoto do $\sim 5 \times 10^9/\text{ml}$ (stacionarna faza)

E. coli: rastna krivulja

- faze rasti (*lag, log, stacionarna*)
- ocena koncentracije:
štetje, A_{550} (600)
- število živih celic \neq število vseh celic
- dolžina *lag*-faze je odvisna od sestave gojišča in prilagojenosti celic na dane rastne pogoje
- rast na trdnem gojišču: celice v različnih fazah rasti



E. coli: delitev

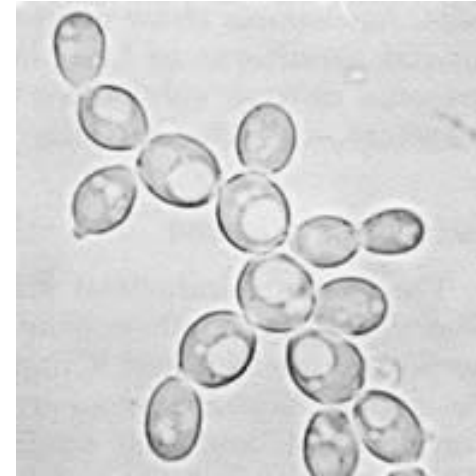
- v optimalnih pogojih vsakih ~20 minut
- 'binarna fizija': celica se podaljša, DNA se deli, hčerinska kromosoma se pritrdita na različna konca cel. membrane, oblikuje se prečna stena, celici se ločita
- vnos tuje DNA: transformacija, transdukcija, konjugacija



Kvasovke

prednosti:

- dokaj hitra rast
- visoke gostote celic
- širok spekter vektorjev
- posttranslacijske modifikacije
- enostavna gojišča

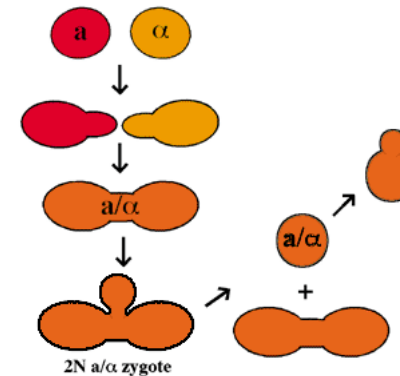
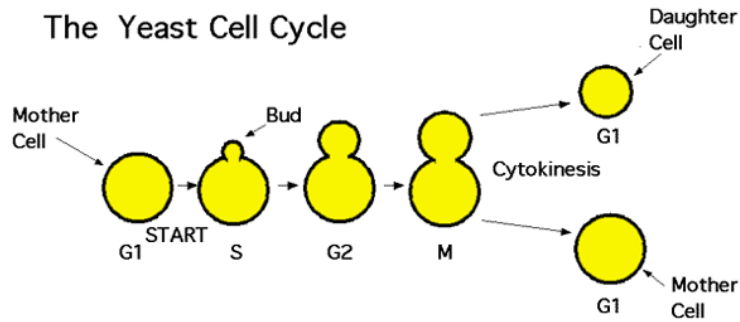
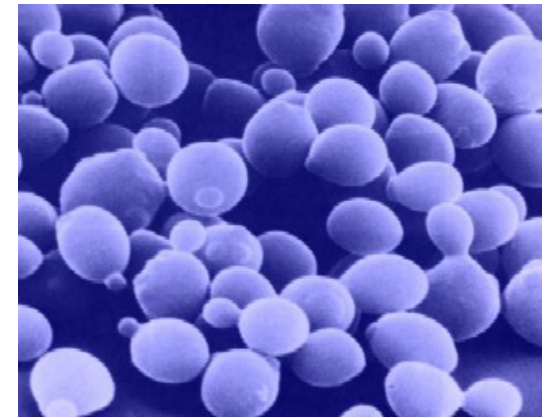


slabosti:

- **hiperglikozilacija**
(*P. pastoris* bolje kot *S. cerevisiae*)
- lahko problemi pri gojenju / slaba ponovljivost rezultatov

Kvasovke / 2

- enocelični evkariontski organizmi, $\Phi \sim 5 \mu\text{m}$
- deli se z brstenjem (na $\sim 2 \text{ h}$) ali spolno



Basic Yeast Information - Figure 2

"a" and "α" haploid cells (1N) can mate to form an "a/α" diploid cell (2N). The "zygote" formed from mating will form a round bud that will undergo cell cycles such as that shown in Figure 1.

- gojimo jih pri 30 °C v aerobnih pogojih
- celotni genom (13 Mb, 16 kromosomov) določen 1996
- *S. cerevisiae* modelni organizem za evkarionte, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* za proizvodnjo rekombinantnih proteinov

Celice višjih evkariontov v kulturi

prednosti:

- pravilne posttranslacijske modifikacije
- omogočajo študij interakcij, lokalizacije *in vivo*

slabosti:

- draga gojišča → za manjše volumne
- počasna rast
- zahtevajo več opreme

Celične kulture

- za rast rabijo kompleksna gojišča
- podvajajo se vsakih ~24 h
- rastejo lahko na podlagi (do zlitja v sloj) ali v tekoči kulturi
- potrebno je redno precepljanje (pasaže)
- celice višjih živali rastejo v atmosferi s CO₂ pri 37 °C
- zamrznjene celice hranimo v tekočem dušiku
- nevarnost okužb celic!

