

Marko Dolinar

Katedra za biokemijo FKKT

Cesta v Mestni log 88a

01/2149 480

Marko.Dolinar@fkkt.uni-lj.si

govorilna ura:

vsak četrtek od 15^h do 16^h

in po dogovoru

Definicije

Iz predloga Zakona o uporabi genske tehnologije:

Gensko inženirstvo je integracija znanstveno-tehničnih postopkov, s katerimi *gene poljubnega izvora prenesemo, pomnožimo, obdržimo in izrazimo v poljubnem organizmu*. To omogoča sestavljanje novih kombinacij genov, ki jih sicer v naravi ni. Celice s spremenjeno dedno zasnovo lahko tudi pripravimo do tega, da sintetizirajo večje količine lastnih spojin, lahko pa tudi spojin, ki sicer niso del njihovega genetskega potenciala.

Genska tehnologija, tehnologija rekombinantne DNA, gensko inženirstvo, genska manipulacija, so izrazi, s katerimi bolj ali manj celovito opisujemo uporabo različnih načinov in tehnik izolacije genov in genskih elementov, njihovo spreminjanje in razvrščanje v nova zaporedja, njihov vnos in pomnoževanje v izbranih gostiteljskih celicah in seveda tudi izražanje v obliki beljakovinskih produktov. V to so zajete tudi metode za preiskovanje (analizo) DNA oziroma kloniranih genov.

Kloniranje genov (molekulsko kloniranje) je ustvarjanje velikega števila enakih kopij nekega gena, ki smo ga vnesli v celico gostiteljskega organizma, npr. v bakterijo. Ko taki, transformirani celici omogočimo, da se na trdni hranilni podlogi s celično delitvijo razraste v kolonijo popolnoma enakih celic, ustvarimo **celični klon**, v katerem imajo vse celice enako dedno zasnovo.

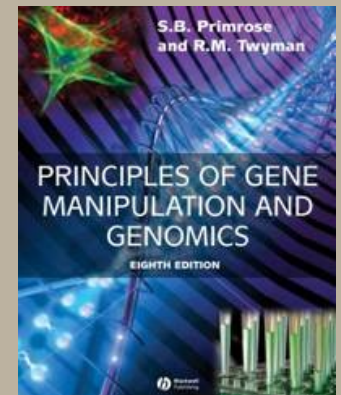
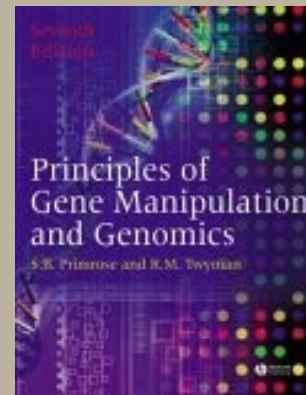
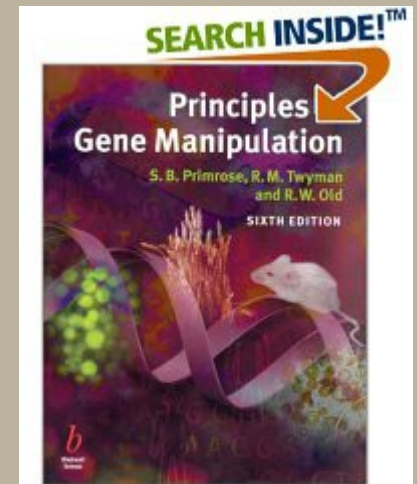
Bistvo genskega inženirstva je v tem, da izbrani fragment DNA nekega organizma, ki smo ga pridobili z ustreznimi postopki rezanja DNA in ga izolirali iz množice ostalih fragmentov, zlepimo z neko drugo molekulo DNA v natančno določeno, želeno zaporedje. Ta druga molekula DNA je navadno prenašalna molekula, vektor (npr. plazmid ali virus), s katerim izbrani fragment prenesemo v drug organizem - gostiteljsko celico, v kateri naj bi se tuji fragment skupaj z vektorjem pomnožil in, če gre za gen, tudi izrazil v obliki ustrezne lastnosti.

Cilji študija

- razumeti postopke za ustvarjanje rekombinantnih organizmov
- razumeti princip pomnoževanja DNA z metodo PCR
- poznati postopke določanja nukleotidnega zaporedja
- razumeti osnovne načine za pripravo rekombinantnih proteinov
- poznati in smiselno upoštevati zakonske in etične omejitve

Študijska literatura

- Sandy Primrose, Richard Twyman, Bob Old:
Principles of Gene Manipulation, 6th ed.
Blackwell Science, Oxford, 2001
- Sandy Primrose, Richard Twyman:
**Principles of Gene Manipulation &
Genomics**, 7th ed. (2006); 8th ed. (2011)
Blackwell Science, Oxford



Ocenjevanje

seminar: 5 %

poročila z vaj: 10 %

kolokvij z vaj: 35 %

teorija: 50 %

Popravljanje ocene je možno samo s ponovnim pisanjem izpita in hkrati kolokvija. Pogoji za opravljen izpit je, da iz teorije dosežete najmanj 50 % točk, da ste pripravili seminar, bili na vseh vajah in ste oddali poročila z vaj. Pri vprašanjih z vaj morate na pisnem delu doseči vsaj 40 % točk in opraviti tudi ustni zagovor.

Meje med ocenami bodo: do 9 % 1, do 19 % 2, do 29 % 3, do 39 % 4, do 48 % 5, do 58 % 6, do 68 % 7, do 77 % 8, do 86 % 9, 87 % ali več 10.

Če se kdo prijavi na izpit, pa se potem ne odjavi, ne vračam prijavnice, vas pa odjavim, če to odločitev sporočite do trenutka, ko dobite v roke izpitna vprašanja oziroma po e-pošti do razpisane ure izpita.

Študijski sklopi 2013/14

- 1 Namen predmeta, potek predavanj; osnove, zgodovina, zakonodaja.
- 2 Laboratorijski organizmi; biološka varnost.
- 3 Elektroforezne metode. Encimi v tehnologiji rekombinantne DNA.
- 4 Vektorji. Reporterski geni.
- 5 Encimska sinteza cDNA. Priprava DNA knjižnic. Transformiranje celic.
- 6 Sinteza DNA *in vitro*. PCR.
- 7 Hibridizacija, sonde – načini označevanja DNA. Določanje nukleotidnega zaporedja.
- 8 Ekspresijski sistemi – splošno.
- 9 Izražanje v prokariontih: vektorji, fuzije, optimizacija proizvodnje.
- 10 Usmerjena lokalizacija, topnost proteina, stabilnost in renaturacija.
- 11 Izražanje v kvasovkah in nitastih glivah.
- 12 Izražanje v gojenih živalskih in človeških celicah.

Zgodnja zgodovina

- 1855 opišejo bakterijo *Escherichia coli*
- 1868 odkritje nukleina (*Miescher*) = DNA
- 1879 odkritje kromatina (*Flemming*) = kromosom (*Waldeyer*, 1888)
- 1909 za dedne bolezni so odgovorni geni
- 1915 odkritje bakteriofagov
- 1927 Rentgenski žarki povzročajo mutacije (*Muller*)
- 1928 odkritje penicilina (*Fleming*)
- 1941 izraz 'genetsko inženirstvo'
- 1953 razjasnjena 3D zgradba DNA (*Watson in Crick*)
- 1954 razvoj tehnik gojenja evkariontskih celic v kulturi
- 1961 razumevanje genetskega koda

Novejša zgodovina

- 1970 izolirali prvo restriktazo
- 1972 sinteza celotnega gena (*Khorana*)
- 1973 prvi uspehi poskusi v genetskem inženirstvu (*Cohen & Boyer*)
- 1976 prva pravila za izvajanje raziskav na področju rekomb. DNA
- 1977 rekomb. bakterije proizvedle človeško beljakovino
- 1981 prva gensko spremenjena rastlina
- 1981 kloniranje miši
- 1985 verižna reakcija s polimerazo (PCR)
- 1989 začetek projekta Človekov genom
- 1990 prva uporaba genskega zdravljenja
- 1995 objavljeno celotno nukleotidno zaporedje *H. influenzae*
- 1997 ovca Dolly (jedrno kloniranje)
- 1999 določeno zaporedje prvega človekovega kromosoma
- 2000 delovna verzija zaporedja celotnega človekovega genoma



Slovenski portal biološke varnosti

Ministrstvo za kmetijstvo in okolje | Ministrstvo za zdravje

- Domov
- Kazalo
- Kontakt
- English

Slovenski portal biološke varnosti

UVOD

GENSKO SPREMENJENI ORGANIZMI

SLOVENIJA

ZAKONODAJA

PRISTOJNI ORGANI IN SLUŽBE

STROKOVNA PODPORA

GSO V SLOVENIJI

EU

ZAKONODAJA

GSO V EU

MEDNARODNO

KARTAGENSKI PROTOKOL

CENTRALNI PORTAL BCH

NACIONALNA BCH

KORISTNE INFORMACIJE

VPRAŠANJA IN ODGOVORI

DODATNE INFORMACIJE

ŽIVLJENJSKI DOGODKI

Dobrodošli na Slovenskem portalu biološke varnosti



Slovenski portal biološke varnosti je osrednja slovenska stran o biološki varnosti pri uporabi in ravnanju z [gensko spremenjenimi organizmi \(GSO\)](#).

Na Slovenskem portalu biološke varnosti vam ponujamo informacije o sistemu biološke varnosti (zakonodaja, pristojni organi, nadzor) v Sloveniji, ki ob uporabi GSO zagotavlja varovanje okolja in zdravlja ljudi, zakonodaji, pristojnih organih.

Aktualno

[10. obletnica Kartagenskega protokola o biološki varnosti h konvenciji o biološki raznovrstnosti](#)

Namen Kartagenskega protokola je zagotavljanje varnega ravnanja, dela, prenosa, transporta in uporabe GSO, ki se pridobivajo z uporabo sodobne biotehnologije in bi lahko imeli škodljive učinke na biodiverzitetu in zdravje ljudi. Kartagenski protokol tako določa mednarodni okvir, ki omogoča, da se v celoti izkoristijo ugodnosti, ki jih prinaša sodobna biotehnologija brez, da so pri tem ogroženi biodiverzitetu in zdravje ljudi. V tem obdobju je bil v okviru Kartagenskega protokola dosežen velik napredek, saj je več kot 100 držav pogodbenic razvilo svoje nacionalne sisteme biološke varnosti, ki so prilagojeni obravnavanju ter odločanju o vlogah za uvoz in izvoz

[Strokovno mnenje o publikaciji o toksičnosti herbicida Roundup in gensko spremenjene koruze NK603](#)

Na svoji 24. seji je Znanstveni odbor za sproščanje gensko spremenjenih organizmov (GSO) v okolje in dajanje izdelkov na trg obravnaval članek »Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize«, avtorjev Séralini s sod., Food and Chemical Toxicology 50(11):4221-4231 (2012), ter podal svoje strokovno mnenje in oceno potrebe za zavzetje varnostnega pridržka v skladu z 51a. členom ZRGSO (23. člen Direktive 2001/18/ES) ali ukrepov ob nesreči v skladu s 34. členom Uredbe (ES) 1829/2003 na podlagi ugotovitev in sprejel strokovno mnenje. Več...

Kartagenski protokol o biološki varnosti h Konvenciji o biološki raznovrstnosti (Nairobi, 1992)

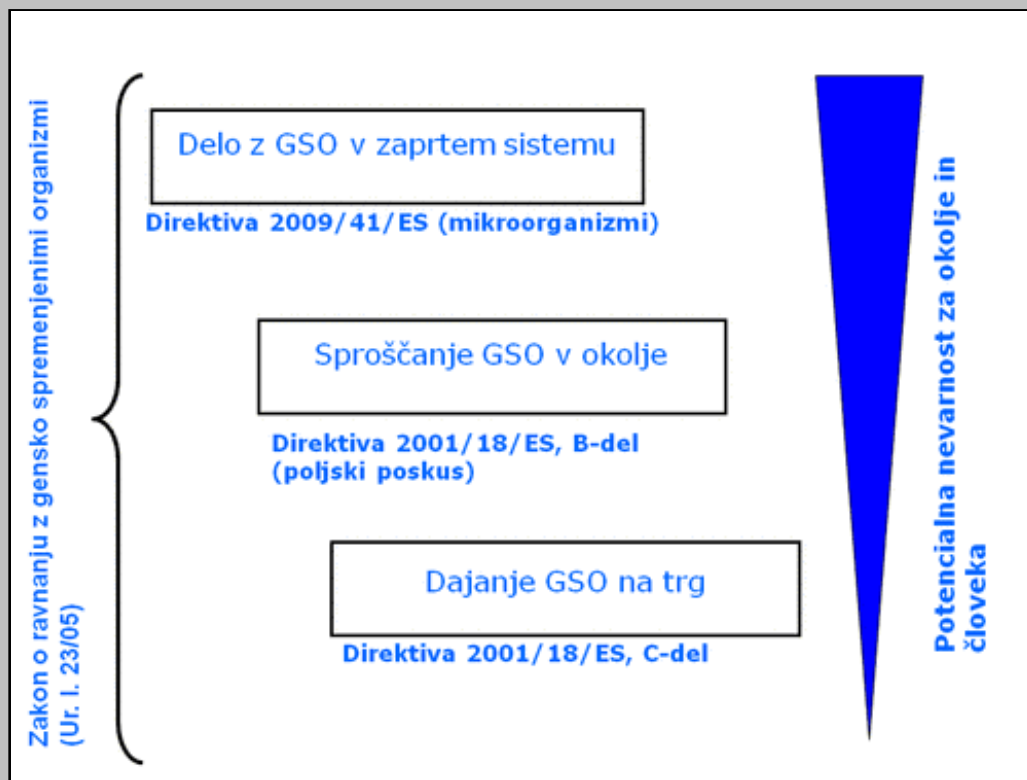
SLO: ratificirala 23.10.2002
velja od 11.9.2003

‘prvi pravno veljavni mednarodni sporazum o prenašanju živih GSO preko meja’

‘Protokol želi varovati biološko raznovrstnost pred potencialnimi tveganji, ki jih predstavljajo živi GSO kot produkti moderne biotehnologije. Vzpostavlja postopek soglasja po vnaprejšnjem obveščanju, ki zagotavlja državam pogodbenicam potrebne informacije za informirano odločitev pred uvozom takšnih organizmov v državo.’

določa načine obveščanja, obveznost lokalnih zakonodaj za urejanje področja, postopke pri izdaji soglasij, nosilce odgovornosti

Evropska in slovenska zakonodaja o GSO glede na področje dela



<http://www.biotechnology-gmo.gov.si/>

Evropski predpisi

(april 1990)

Direktiva Sveta Evrope o uporabi GMM v zaprtih sistemih
90/219/EEC → spremembe 98/81/EC → 2009/41/EC

Direktiva Sveta Evrope o namernem sproščanju GSO v okolje in njihovem dajanju na trg
90/220/EEC → spremembe 2001/18/EC

(december 1996)

Konvencija Sveta Evrope o varovanju človekovih pravic in dostojanstva človeškega bitja v zvezi z uporabo biologije in medicine

- biomedicinska etika
- človeški genom (4. poglavje)

Priporočila (vladam članic):

R(90)/13 Priporočilo Odbora ministrov o predrojstnem genskem presejanju, genski diagnostiki in genetskem svetovanju

R(92)/1 Priporočilo Odbora ministrov o rabi analize DNA v okviru kazenskoprnega sistema

R(92)/3 Priporočilo Odbora ministrov o genskih preiskavah in presejanju za zdravstvene namene

Direktiva Sveta Evrope 98/81/EC,

ki dopolnjuje 90/219/EEC o uporabi GMM* v zaprtih sistemih

Stopnje zaprtosti sistema glede na stopnjo tveganja – varnostni razredi:

- 1. razred: aktivnosti brez ali z zanemarljivim tveganjem
- 2. razred: aktivnosti z nizkim tveganjem
- 3. razred: aktivnosti z zmernim tveganjem
- 4. razred: aktivnosti z velikim tveganjem

Značilnosti GMM, ki sodijo v 1. varnostni razred:

- Ni verjetno, da bi prejemniški mikroorganizem povzročal bolezni pri človeku, živalih in rastlinah (klasifikacija po Direktivi EEC 90/679)
- Narava vektorja in inserta GMM ne daje fenotipa, za katerega bi bilo verjetno, da bi povzročal bolezni ali imel škodljive učinke na okolje
- Ni verjetno, da bi GMM povzročal bolezni ali imel škodljive učinke na okolje

* *GMM=gensko spremenjeni mikroorganizmi*

Direktiva Sveta Evrope 98/81/EC (2)

Elementi za presojo (aneks III):

- **Škodljivi učinki:** povzročanje bolezni pri človeku (tudi alergeni in toksični učinki), živalih in rastlinah, povzročanje nezmožnosti zdravljenja ali učinkovite profilakse, škodljivost zaradi uveljavljanja in širjenja v okolju, zaradi naravnega prenosa vključenega genetskega materiala na druge organizme
- Oceno mora temeljiti na osnovi **identifikacije možnih škodljivih učinkov** (prejemniškega mikroorg., vnesenega genetskega materiala, vektorja, donorskega mikroorg. in dobljenega GMM), značilnosti dela, resnosti možnih škodljivih učinkov, verjetnosti, da do škodljivih učinkov res pride.
- Upoštevati je treba tudi **značilnosti okolja**, s katerim bi GMM lahko prišel v stik, značilnosti dela z GMM (obseg), nestandardne postopke (npr. aerosoli)

Ocena tveganja

Tema seminarjev – dogovorili se bomo za rok za oddajo.

Razumeti je treba naravo vektorja, vključka, gostitelja, okolja, kjer poteka delo (predpostavka: zaprti sistem) ter njihove kombinacije in predvideti možne nevarnosti..

Tveganje (risk): verjetnost neželenega dogodka.

Tveganje je posledica neke negotovosti ob pogoju izpostavljenosti.

Direktiva Sveta Evrope 98/81/EC (3)

Varnostni ukrepi (člen 6 in aneks IV):

- delovni prostor in okolje izpostavljam GMM do najnižje praktično izvedljive stopnje
- izvajamo tehnične zaščitne ukrepe pri izvoru in če je treba, uporabljamo osebna zaščitna oblačila in opremo
- ustrezno preverjamo in vzdržujemo kontrolne ukrepe in opremo
- če je potrebno, preverjamo prisotnost živih procesnih organizmov izven omejenega sistema
- primerno usposabljam osebje
- po potrebi ustanavljam odbore za biološko varnost
- definiramo in izvajamo potrebna navodila za varnost osebja
- kjer je potrebno, označujemo biološko nevarnost z znakom
- poskrbimo za možnost umivanja in dekontaminacije za osebje
- vodimo ustrezno dokumentacijo o delu
- prepovemo hranjenje, pitje, kajenje, ličenje ali hrambo hrane za ljudi v območju dela
- prepovemo pipetiranje z usti
- kjer je potrebno, poskrbimo za pisne standardne delovne postopke, ki zagotavljajo varnost
- za primer razlitja GMM imamo na razpolago učinkovita sredstva za dezinfekcijo in postopke za njihovo uporabo

Direktiva Sveta Evrope 2001/18/EC

Nanaša se na sproščanje GSO v okolje in dajanje na trg.

- Določa postopke prijave, izdelave varnostne presoje, monitoringa, časovnih rokov, odgovornosti in sporočanja o dogodkih.
- Priloge dajejo natančna navodila o tem, kako je treba pripraviti varnostno presoj (priloga II), kaj mora vsebovati prijava (prilogi III in IV) in kaj ocena prijave (priloga VI) ter katere parametre je treba spremljati pri preverjanju izvajanja (monitoring; priloga VIII in dodatna navodila).
- Države članice morajo zagotoviti sledljivost in označevanje dovoljenih GSO v vseh stopnjah priprave in dajanja na trg.
- Sproščanje v okolje mora potekati po predhodni prijavi, presoji vplivov na okolje in odobritvi s strani pristojnega organa. Sproščanje v okolje mora biti postopno.
- Dopolnitev direktive: Odločitev Evropske komisije 2002/623/EC - dopolnilna navodila k prilogi II.