

VILNIAUS UNIVERSITETAS

RAPOLAS SPALINSKAS

GENETIŠKAI MODIFIKUOTŲ AUGALŲ TRANSGENINIŲ INTARPŲ
MOLEKULINIS APIBŪDINIMAS KURIANT, OPTIMIZUOJANT IR TAIKANT
POLIMERAZINE GRANDININE REAKCIJA PAGRĮSTUS METODUS

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, biologija (01 B)

Vilnius, 2014

Disertacija rengta 2008–2014 metais Europos Komisijos Generalinio Direktorato Jungtinio tyrimų centro Sveikatos ir vartotojų apsaugos instituto Molekulinės biologijos ir genomikos padalinyje bei Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Botanikos ir genetikos katedroje.

Mokslinis vadovas:

prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Konsultantė:

dr. Anne Milcamps (Europos Komisijos Generalinis Direktoratas Jungtinis tyrimų centras).

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biologijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė – prof. habil. dr. Izolda Pašakinskienė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B)

Nariai:

prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

prof. dr. Arvydas Lubys (ThermoFisher Scientific Baltic, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B);

prof. dr. Donatas Žvingila (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Oponentai:

prof. habil. dr. Kęstutis Sasnauskas (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – 05 T);

prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01 B).

Disertacija bus ginama viešame Biologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2014 m. rugsėjo 30 d. 11⁰⁰ val. Gamtos mokslų fakulteto Didžiojoje auditorijoje (214 kab.).

Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21/27, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2014 m. rugpjūčio mėn. 29 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje.

IVADAS

Viena iš greičiausiai besivystančių biotechnologijos mokslo sričių pastaruosius tris dešimtmečius yra genetiškai modifikuotų (GM) augalų kūrimas ir jų naudojimas pramonėje, maistui ir pašarams. Vien 2013 m. pasaulyje pasėta 1,5 milijardo hektarų pasėlių iš kurių 12 % buvo kultūriniai augalai, išvesti naudojant biotechnologijas. Tai yra 100 kartų didesni transgeninių pasėlių plotai, nei jų pasėta 1996 m. (James 2013). Dėl tiesioginio GM augalų poveikio vartotojui, šiai biotechnologijų sričiai plėtojantis, atsirado poreikis sukurti išsamią ir griežtą kontrolės sistemą, kurios sprendimai yra pagrįsti mokslinių tyrimų rezultatais. Tai reiškia, kad kultūriniai GM augalai ir visa produkcija iš šių augalų turi būti išsamiai ištirta molekulinio lygmeniu, o gauti patikimi analitiniai duomenys vėliau padėtų priimti politinius sprendimus, susijusius su GM augalų kultivavimu, prekyba, produktų žymėjimu, maksimalaus kiekio sudėtyje toleravimu, bei priimti kitus sprendimus. Toks naujoviškas didelis tyrimų ir kontrolės ciklas ne tik lėmė naujų institucijų atsiradimą, bet ir gamtos mokslų specialistų kvalifikavimąsi tirti genetiškai modifikuotus organizmus (GMO). Kadangi GMO kontrolė yra nuolat atsinaujinanti ir besiplečianti sritis, analitinių duomenų poreikis kinta. Dar neseniai užteko kokybinės informacijos, nusakančios GM buvimą produkte, o šiuo metu svarbesnė yra kiekybinė analizė (GMO kiekis produkte). Platesnis analitinių duomenų spektras lemia tvirtesnius, mokslu pagrįstus sprendimus, o tai lemia teigiamus rezultatus kiekvienam vartotojui.

Europos Sąjunga turi bene griežčiausią GMO reglamentavimą visame pasaulyje. Tam, kad naujam GMO būtų suteikiamas leidimas Europos Sąjungoje (autorizacijos procesas), Europos Komisija (EK) priima sprendimą, paremtą individualaus tyrimo rezultatais, kuriuos pateikia Europos maisto saugos tarnyba (EMST). 2014-aisiais metais EK registras apima informaciją apie 48 ES autorizuotus GMO ir 15 GMO, kurių leidimas Sąjungoje planuojamas artimiausiu metu arba leidimo galiojimas pasibaigęs (EU Register of Authorized GMOs 2014). Iš visų leistinių GMO šios disertacijos rašymo metu kultivuoti ES šalyse narėse buvo leidžiama tik du kultūrinius GM augalus: kukurūzą MON810 (prekybinis pavadinimas „YieldGard“; maistinis javas; kukurūzas, sintetinant delta endotoksina) ir bulvę EH92-527-1 (prekybinis pavadinimas „Amflora“; pramoninės paskirties kultūrinis augalas; bulvė, sintetinti daugiau amilopektino). Leidimo ES suteikimo vyksmų seka prasideda nuo analizės, kai interesantas pateikia paraišką su plataus masto patikimais moksliniais duomenimis. Kokia yra eksperimentinė GMO analizės dalis ir kaip gaunami analitiniai rezultatai GMO įvertinimui, iš dalies aprašoma šioje disertacijoje.

Pateiksime transgeninių nukleotidinių sekų ir aplinkinių augalo genomo sekų apibūdinimo molekulinio lygmeniu strategijas. Pirma tyrimų dalis skirta gerai žinomo metodo – ilgagrandės polimerazinės grandininės reakcijos (I-PGR) pritaikymui siekiant pagausinti visą transgeninio GM augalo intarpą ir jį išgryninti viename nedalomame DNR fragmente. Galimybė pagausinti ir išskirti visą ir nedalomą transgeninį intarpą nuo vienos augalo genomo sekos, supančios transgeninį intarpą, iki kitos leistų įtvirtinti I-PGR kaip pirmenybinį metodą tiriant GMO. Kadangi transgeninio intarpo vientisumas yra labai svarbus GMO saugumo tyrimų veiksnys, jo egzistavimą taip pat būtų galima

patvirtinti pritaikant „pasivaikščiojimo pradmenimis“ sekoskaitos metodą. Šio metodo tikslumas yra didžiausias, nes kiekviena sekoskaitos reakcija pasitarnauja kaip naujo, tolesnę sekoskaitą įgalinančio pradmens kūrimo pagrindas. Taigi, I-PGR tyrimo tikslas yra patikrinti metodo galimybes sintetinant ilgus DNR fragmentus ir juos tiksliai nuskaitant „pasivaikščiojimo pradmenimis“ sekoskaitos būdu. Nustačius pirminius metodo parametrus dirbant su GMO, kitas žingsnis yra išsiaiškinti DNR matricų kokybės įtaką metodui, taip pat tyrimo jautrumą matricai, jos koncentraciją ir kt. Tai yra svarbu todėl, kad, aplinkoje atsiradus naujam nežinomam GMO, dažniausiai išskirta DNR yra labai mažai koncentruota ir (arba) prastos kokybės. Visiškai atvirkščiai yra dirbant su autorizuotais GMO, kurių DNR galima išskirti iš augalų arba jau nusipirkti 100 % koncentracijos DNR be priemaišų. Taip pat rinkai tiekiamos ir sertifikuotos etaloninės medžiagos (SEM), kuriose modifikuoto augalo DNR sudaro tam tikras įvairias DNR mėginio procentines dalis. Visi šie šaltiniai, iš kurių gaunama modifikuotų augalų DNR, gali būti tinkami arba netinkami taikant sudėtingus molekulinės biologijos metodus, todėl mes išsikėlėme tikslą nustatyti tyrimams palankiausias DNR preparatus.

Kadangi I-PGR yra didelio jautrumo metodas, neteisingai parinktos bent vieno iš daugumos kintamųjų reikšmės gali lemti reakcijos nesėkmę: polimerazei per anksti atsiskiriant nuo matricos, susidaro antrinės DNR struktūros ir blokuojama polimerizacija, neefektyviai lydosi pradmenys ir kt. Tokiais atvejais dažniausiai svarstoma galimybė naudoti PGR priedus. Vienas iš naujausių, hipotetiškai potencialių PGR priedų yra anglies nanovamzdeliai (ANV). Šios nanodalelės gali padidinti I-PGR specifiškumą, reakcijos stabilumą ir paveikti reakcijos išeigą. Dėl mokslinio naujumo mes išsikėlėme uždavinį patikrinti ANV, t. y. beveik netirpų, riboto pritaikymo, mažai ištirtą PGR cheminį priedą. Papildomai gauti techniniai duomenys apie daugiasienių ANV ruošimą, tvarkymą ir panaudojimą suteiktų žinių taikomajam mokslui, ypač molekulinės biologijos sritims, susipynusioms su medžiagų mokslais.

Kita labai svarbi GMO tyrimų molekulinio lygmeniu strategija yra duomenų apie transgeninį intarpą supančias augalo genomo DNR sekas rinkimas. Kadangi transgeninio intarpo elementai dažnai yra žinomi iš anksto arba aptinkami, prie jų prisijungusias nežinomas genetines sekas galima aptikti įvairiais „pasivaikščiojimo genomu“ (PG) metodais. Prioritetinis DNR sekų, supančių transgeninį intarpą, metodas iki šių dienų taikomajame moksle nenustatytas. Iš rezultatų, pateiktų šiame darbe, matyti, jog mažiausiai laiko eikvojanti potenciali technologija, lemianti teigiamus rezultatus, yra PG. Iš didelės PG metodų įvairovės nėra vieno atrinkto metodo, kuris būtų pirmiausia taikomas GMO tyrimams, bet yra galimybė kurti ir modifikuoti metodus pagal poreikį. Jei metodas tinkamai sukuriamas ar pritaikomas GMO tyrimams, jis turi būti produktyvus, lengvai taikomas ir tinkamas GMO matricoms tirti. Kaip tik atsižvelgiant į naudojamas DNR matricas turi būti nustatomi didžiausio metodo efektyvumo parametrai, t. y. metodas turi būti optimizuojamas. Kadangi iki šiol modifikuotuose organizmuose dažniausiai naudojamas transgeninis elementas yra žiedinių kopūstų mozaikos viruso 35S aktyvatorius (P-35S promotorius), pranašumas yra turėti universalių pradmenų rinkinį šiam elementui, taikant bet kurį PG metodą. Dėl savo stiprumo ir efektyvumo transgeninėse nukleotidų konstrukcijose P-35S yra ir toliau bus sėkmingai naudojamas kuriant naujus GMO, o bet kokia informacija apie P-35S yra labai reikalinga.

Galiausiai, PG metodo patikimumo kontrolei reikia atlikti taikomąjį tyrimą, kad metodas būtų išmėgintas su skirtingais bandiniais. Savo tyrimuose užsibrėžėme atlikti optimizuoto PG metodo testavimą naudodami penkių skirtingų genetiškai modifikuotų augalų rūšių DNR. Šiuo tikslu įsigijome didžiausią 100 % koncentracijos modifikuotų augalų DNR asortimentą, kuris yra laisvai prieinamas rinkoje. Jei metodas pasirodytų veiksmingas ir patikimas su skirtingų rūšių DNR bandiniais, toks rezultatas reikštų galimybę pritaikyti metodą realioje situacijoje, kai rinkoje aptinkamas, identifikuojamas ir aprašomas naujas, neautorizuotas ar nežinomas GMO. Toks taikomasis tyrimas bus aprašytas mokslinėje spaudoje kaip atskira publikacija, o nuskaitytos DNR sekos įkeltos į pasaulines duomenų bazines.

Šioje disertacijoje nagrinėjami klausimai ir hipotezės, susijusios su GMO tyrimais, bandant juos aptikti, identifikuoti ir, svarbiausiai, aprašyti molekulinio lygmeniu. Šiame darbe aprašyti du skirtingi būdai, leidžiantys nukopijuoti ir pagausinti transgenines GMO nukleotidų sekas ir augalo genomo DNR sekas, supančias transgeninį intarpą. Detaliai pateikiamos šių būdų taikymo subtilybės ir išskylančios sunkumai. Strategiškai pritaikant metodus kasdieniame eksperimentiniame darbe, kiekvienas buvo optimizuojamas siekiant maksimaliai padidinti tikslumą (specifiškumą) ir išeią (produkto kiekį). Be to, bet kuris taikytas ar kurtas metodas buvo ruošiamas taip, kad jį būtų nesunku pritaikyti kasdieniame laboratorijos darbe, nes tokia savybė visada yra taikomojo mokslo siekiamybė.

DARBO TIKSLAS

PGR taikymu pagrįstų metodų kūrimas, optimizavimas ir pritaikymas siekiant molekulinio lygmeniu tirti transgeninius interpus ir augalo genomo DNR aplink juos.

DARBO UŽDAVINIAI

- (1) Įrodyti galimybę I-PGR metodu nukopijuoti ir pagausinti kelių GM augalų vienalytį DNR fragmentą su visu transgeniniu intarpu ir įrodyti to fragmento vientisumą „pradmenų pasivaikščiojimo“ sekoskaitos metodu.
- (2) Iširti hipotetiškai veiksmingus hidrofobinius PGR priedus, vadinamus anglies nanovamzdeliais: nustatyti jų poveikį I-PGR specifiškumui, reakcijos stabilumui ir įtaką reakcijos produkto kiekio svyravimams.
- (3) Sukurti ir optimizuoti novatorišką ir patikimą modifikuotų augalų transgeninės DNR tyrimo metodą, kuris leistų išgauti ir nustatyti nežinomas DNR nukleotidų sekas, prisijungusias prie žinomų DNR regionų.
- (4) Remiantis statistiniais dažniausiai transgeniniuose intarpuose naudojamų elementų skaičiavimais, sukonstruoti ir patikrinti universalų dvikrypčių pradmenų rinkinį P-35S aktyvatoriui, kuriuos būtų galima naudoti taikant „pasivaikščiojimo genomu“ ar PGR paremtus metodus.

(5) Pritaikyti sukurtą „pasivaikščiojimo genomu“ metodą penkiems skirtingų rūšių GMO ir nustatyti genų bankuose nesamas transgenines sekas, taip įrodant metodo patikimumą ir pritaikomumą.

MOKSLINIS NAUJUMAS

- Daugiasienių anglies nanovamzdelių pritaikymas I-PGR reakcijos specifiškumo, stabilumo ir išeigos didinimo tikslais yra neaprašytas arba labai menkai aprašytas mokslinėje spaudoje. Šis novatoriškas PGR priedas iki šiol visai nebuvo naudotas GMO tyrimams.
- Lengvai rutiniškai taikomo, nepriklausomo nuo DNR karpymo, adapterio ligavimu pagrįsto „pasivaikščiojimo genomu“ metodo, sulieto su I-PGR metodu, kūrimas ir optimizavimas siekiant nukopijuoti, pagausinti ir nuskaityti nežinomus DNR fragmentus, prisijungusius prie žinomų sekų.
- Minėto metodo taikymas atrinktiems GMO, kad būtų galima aptikti naujas, viešosiose mokslo duomenų bazėse nepaskelbtas DNR transgenines sekas.

TYRIMŲ OBJEKTAS, MEDŽIAGOS IR METODAI

Tyrimų objektas. Šiame darbe buvo tiriami kultūriniai GM augalai: cukriniai runkeliai H7-1, kukurūzai Bt11, kukurūzai MON810, sėjamieji ryžiai LLRICE62, sojos A2704-12, rapsai T45 ir vilnamedžiai LLCOTTON25.

Medžiagos. Tyrimų medžiaga tiriamaisiais tikslais buvo gauta iš mokslinių institucijų arba įsigyta iš rinkoje egzistuojančių katalogų: Etaloninių medžiagų ir matavimų instituto (EMMI); KWS SAAT AG kompanijos; „Syngenta“ kompanijos; Ispanijos nacionalinio žemės ūkio tyrimų instituto; Amerikos naftos chemikų draugijos; „Promega“ kompanijos ir Jungtinių tyrimų centro padalinių.

DNR išskyrimas ir kokybės nustatymas. DNR išskirti buvo naudojami šie rinkiniai: „NucleoSpin Food DNA extraction kit“, „NucleoSpin Plant II Maxi kit“ (Macherey-Nagel, Vokietija) ir „DNeasy Plant Mini Kit“ (Qiagen, Vokietija). DNR išskyrimas vykdytas atsižvelgiant į gamintojų pateiktas rinkinių naudojimo taisykles. DNR kokybė patikrinta agarozės gelyje elektroforezės būdu, o koncentracija apskaičiuota naudojant „PicoGreen dsDNA Assay kit“ (Invitrogen, JAV) bei Lambda DNR molekulinį standartą (Promega, JAV). DNR matrica ir PGR produktai buvo stebimi 1 % agarozės gelyje, kuriame buvo galutinė 0,2 µg/ml etidžio bromido koncentracija. DNR elektroforezė buvo vykdoma agarozės gelyje, TBE buferinėje sistemoje, esant 5 V/cm įtampai. Jei DNR fragmentas po elektroforezės buvo gryninamas ekscizijos iš gelio metodu, rutiniškai į agarozę dedamas etidžio bromidas buvo pakeičiamas itin mažomis mutageninėmis savybėmis pasižyminčiu dažikliu „SYBR Safe DNA Gel Stain“ (Invitrogen, JAV). DNR fragmentui gryninti iš agarozės gelio buvo naudojamas „ZymoClean Gel DNA Recovery Kit“ (Zymo Research, JAV).

PGR ir I-PGR. Standartinei PGR buvo naudojamas rinkinys „FastStart High Fidelity PCR System kit“ (Roche, Vokietija) ir 50 µL reakcijai – nutitruota 1X buferinė sistema, kurioje buvo 2 mM MgCl₂, 0,2 mM visų dNTP, 2 V *Taq* polimerazės ir 50 ng DNR matricos. Reakcijoje buvo iki 100 pikomolių kiekvieno pradmens. Standartinis protokolas: pirminė denatūracija 94 °C– 4 min; denatūracija 94 °C– 30 s; pradmenų prijungimas 60 °C– 30 s; pailginimas 72 °C– 1 min; baigtinis pailginimas 72 °C – 7 min. Procedūra kartota 30 ciklų be pirmo ir paskutinio protokolo žingsnių pakartojimų. I-PGR buvo naudojami du rinkiniai: „Expand Long Template PCR system“ (Roche, Vokietija) ir „PhusionTM HotStart High-Fidelity DNA Polymerase“ (Finnzymes, Suomija). Pirmajame rinkinyje fragmentams iki 9 Kb buvo naudojama 1 buferinė sistema, ilgesniems kaip 12 Kb fragmentams buvo naudojama 3 buferinė sistema. Tipinėje Roche rinkinio 25 µL I-PGR buvo 1X PGR buferinės sistemos, 0,2 mM kiekvieno dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 7,5 pikomolių kiekvieno pradmens ir 2,5 V polimerazių *Taq* ir *Tgo* mišinio. Standartinis protokolas: pirminė denatūracija 92 °C– 2 min; denatūracija 92 °C– 30 s; pradmenų prijungimas 60–67 °C– 30 s; pailginimas 68 °C– iki 12 min; baigtinis pailginimas 68 °C– 7 min. Procedūra kartota 30 ciklų be pirmo ir paskutinio protokolo žingsnių pakartojimų. Tipinėje Finnzymes rinkinio 25 µL reakcijoje buvo 1X PGR buferinės sistemos, 0,2 mM kiekvieno dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 12,5 pikomolių kiekvieno pradmens ir 0,5 V Phusion DNR polimerazės. Standartinis protokolas: pirminė denatūracija 98 °C– 30 s; denatūracija 98 °C– 10 s; pradmenų prijungimas 60–74 °C –

30 s; pailginimas 72 °C– iki 7 min; baigtinis pailginimas 72 °C– 5 min. Procedūra kartota 30 ciklų be pirmo ir paskutinio protokolo žingsnių pakartojimų. Visose I-PGR naudota 200 ng DNR matricos. Visos PGR ir I-PGR buvo vykdomos „Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700“ termocikleriuose su aukso lydinio temperatūrų blokais.

RADE ir LT-RADE. Šie metodai yra pagrįsti daliniu 5'RACE rinkinio (Invitrogen, JAV) procedūros atlikimu, kartu suliejant standartinės adapterinės ir lizdinės PGR arba I-PGR principus. Augalo genomo DNR naudojama kaip matrica. Eksperimentų metu rinkinių dalys ir cheminiai reagentai nebūtinai buvo naudojami pagal protokole aprašytą standartinį būdą. RADE ir LT-RADE yra suskirstytas į penkis pagrindinius žingsnius:

- Vieno pradmens ilginimas. Naudojant 0,5 µg genominės DNR ir pirmą žinomai DNR sekai specifinį pradžmenį (60 pikomolių), 100 µl reakcijoje su 0,4 mM kiekvieno dNTP ir 7,5 V *Taq* arba *Taq+Tgo* polimerazės mišinio; 35 ciklų metu yra pagausinamas viengrandinės DNR fragmentas.
- Fragmento išgryninimas. Šiam etapui naudojamos „S.N.A.P kolonėlės“, kurios pritaikytos viengrandinei DNR išgryninti.
- Homopolimerinės „uodegos“ prijungimas. Prie išgryninto fragmento galo, naudojant nuo matricos nepriklausomą polimerazę– terminalinę deoksinukleotidiltransferazę (TdT), prijungiama poli-dC „uodega“. Šioje reakcijoje naudojama 1X buferinė „uodegos prijungimo“ sistema, 0,2 mM dCTP ir TdT, o reakcija vykdoma pagal „uodegos“ prijungimo protokolą.
- Adapterinė PGR. 5 µl trečio žingsnio produkto buvo naudojami adapterinėje PGR, kurios 50 µL tūryje buvo 1X PGR buferinė sistema, 0,2 mM kiekvieno dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 V *Taq* arba *Taq+Tgo* polimerazės mišinio. Šioje reakcijoje buvo naudojama 20 pikomolių kiekvieno pradmens: antras žinomai DNR sekai specifinis pradmuo ir AAP (Invitrogen) adapterio pradmuo, besilydantis prie poli-dC.
- Lizdinė PGR. Adapterinės PGR produktas buvo atskiedžiamas 100 kartų ir 5 µl šio skiedimo buvo naudojami lizdinei PGR vykdyti tokia pat reakcijos mišinyje, kuriame buvo vykdoma adapterinė PGR. Reakcija skyrėsi tik pradmenimis, buvo naudojama po 10 pikomolių kiekvieno pradmens: trečiojo žinomai DNR sekai specifinio pradmens ir AUAP (Invitrogen) universalios adapterio sekos pradmens.

Molekulinis klonavimas ir sekoskaita. Visų DNR fragmentų sekoskaita buvo atlikta „Microsynth GmbH“ (Šveicarija). Buvo atlikta arba tiesioginė fragmento sekoskaita, arba plazmidėje įterpto fragmento sekoskaita. Neapdorotos DNR sekos buvo tvarkomos ir konsensusas palyginimų analizei rengiamas naudojant Lasergene 7 programinę įrangą (DNASTar, JAV). Kadangi dažniausia mums nepavykdavo išgryninti itin didelės koncentracijos DNR fragmento, kuris yra būtinas tiesioginei sekoskaitai, fragmentai buvo klonuojami į plazmides. I-PGR fragmentams buvo naudojamas vektorius pJAZZ-OK Blunt (Lucigen, JAV), kitiems PGR fragmentams buvo naudojamas pCR2.1-TOPO vektorius (Invitrogen, JAV). Visais atvejais paruoštas vektorius su DNR fragmentu buvo įterpiamas į *E. coli* ląsteles elektroporacijos metodu, naudojant „Gene Pulser Xcell Electroporation System“ (BioRad, JAV). Molekulinis klonavimas buvo vykdomas atsižvelgiant į klonavimo rinkinių gamintojų protokolus.

Nanodalelių dispersija. Tam, kad gautume hidrofobiškų anglies nanovamzdelių dispersiją vandenyje, naudojome „Sonics VCX-750“ (Sonics&Materials, Inc, JAV) zondinį ultragarso aparatą. Nanodalelių dispersijos buvo gaunamos penkias minutes, intervalais po 30 s, taikant 35 % ultragarso amplitudę su 10 s pertraukomis. Kad vanduo nenugaruotų dėl ultragarso zondo sukkelto karščio, dispersijos reakcijos buvo atliekamos ledo vonelėse.

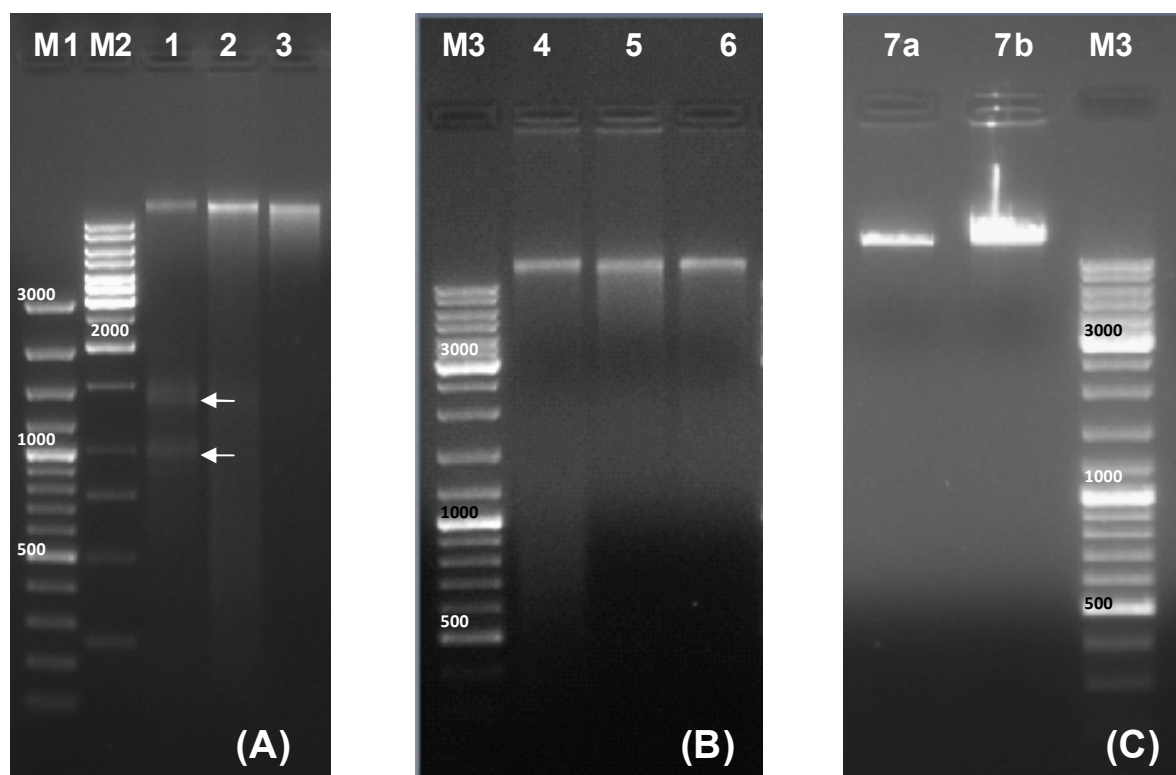
Pradmenys. Standartiniai oligonukleotidiniai pradmenys visoms PGR buvo kuriami atsižvelgiant į visas pradmenų molekulinę savybių taisykles. Pradmenys buvo kuriami arba tikrinami naudojant Lasergene 7 programą „PrimerSelect“. Prieš naudojant pradmenis eksperimentams, buvo atliekama jų palyginimo analizė (BLAST).

DNR sekų įkėlimas į duomenų bazes. PG tyrimuose gautos DNR sekos buvo įkeltos į tarptautinę DNR sekų duomenų bazę „Genbank“. Kukurūzų MON810 sekų numeriai: JQ406879, JQ406878, JX139718; sėjamųjų ryžių LLRICE62 sekų numeriai: JQ406881, JQ406880, JX139719; rapsų T45 sekų numeriai: JX139721, JX139720; sojų A2704-12 sekų numeriai: JX139723, JX139722; vilnamedžių LLCOTTON25 sekų numeriai: JX139725, JX139724.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1. I-PGR visam transgeniniam intarpui nukopijuoti ir pagausinti

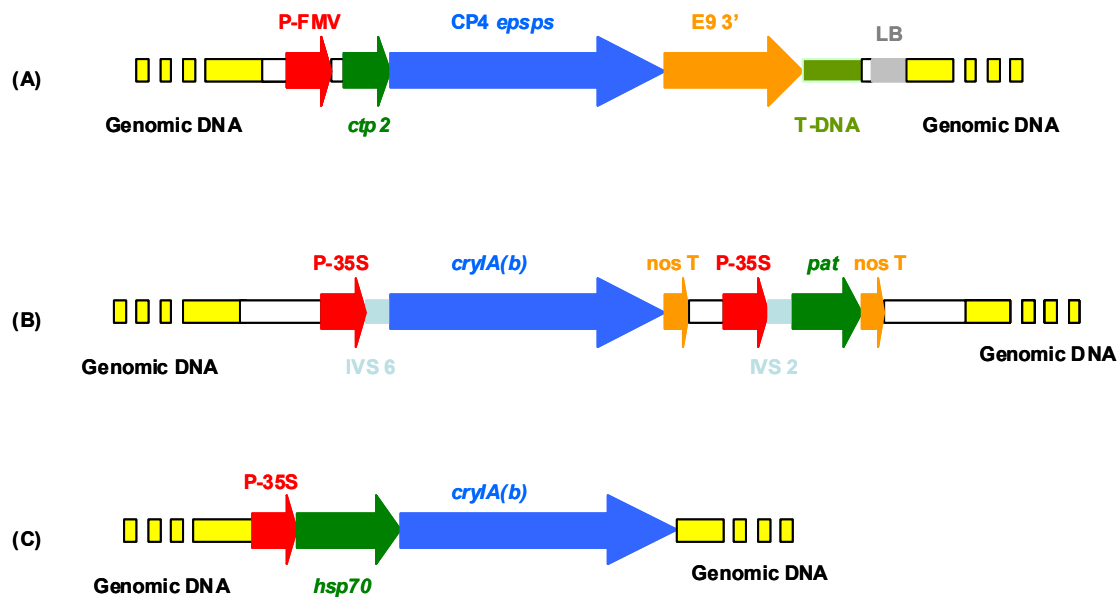
Nepertraukiamo transgeninio intarpo nukopijavimo ir pagausinimo I-PGR metodu tyrimas buvo atliekamas su trijų GM augalų DNR matricomis: cukrinių runkelių H7-1, kukurūzų Bt11 ir kukurūzų MON810. Eksperimentams naudota DNR buvo išskirta iš sertifikuotos etaloninės medžiagos (SEM), augalų sėklų ir (arba) augalų lapų. DNR matricos testavimas I-PGR metodo taikomajame tyrime buvo svarbus tuo, kad skirtingi DNR preparatai yra skirtingu mastu degradavę, o nuo to labai priklauso tokio jautraus metodo kaip I-PGR sėkmė. Cukrinių runkelių H7-1 DNR buvo skiriama iš 100 % SEM, augalų lapų ir grūstų sėklų; kukurūzų Bt11 DNR buvo skiriama iš 5 % SEM, augalų lapų ir grūstų sėklų; kukurūzų MON810 DNR buvo skiriama iš 5 % SEM. Nors kokybės įvertinimas agarozės gelyje parodė, jog aukščiausios kokybės DNR (mažiausiai degradavusi, didžiausios koncentracijos) yra išskirta iš augalų lapų, tolesniems H7-1 tyrimams pasirinkome prasčiausios kokybės (su aiškiai matoma fragmentacija agarozės gelyje) DNR, išskirtą iš SEM (1 paveikslas). Toks pasirinkimas buvo motyvuojamas tuo, jog dažnai, rinkoje pasirodžius produktui, kuriame yra neatpažinta ar neautorizuota transgeninė medžiaga, gautos DNR kokybė gali būti itin prasta. Taigi vienas iš uždavinių buvo patikrinti prastesnės DNR matricos naudojimą eksperimentams.



1 paveikslas. DNR matricų įvertinimas. (A) Cukrinių runkelių H7-1 DNR: 1 juosta – 100 % SEM DNR, 2 juosta – augalų lapų DNR, 3 juosta – grūstų sėklų DNR. (B) Kukurūzų Bt11 DNR: 4 juosta – 5 % SEM DNR, 5 juosta – grūstų sėklų DNR, 6 juosta – augalų lapų DNR. (C) Kukurūzų MON810 DNR: 7a ir 7b juostos – 5 % SEM DNR. Molekuliniai masių standartai: M1 – GeneRuler™ 100 bpPlus DNA Ladder; M2 – GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder; M3 – GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Lietuva).

Cukriniai runkeliai H7-1. Turėdami nedaug informacijos apie augalo geno sekas, supančias transgeninį H7-1 intarpą (2 paveikslas), toms sekoms sukūre atitinkamus pradmenis (SBHG1 ir G2 nukreipti į vieną pusę; SBHGR1 ir GR2 nukreipti į kitą pusę). Vienoje transgeninio intarpo pusėje augalo DNR seka buvo labai trumpa ir neatitinkanti pagrindinių pradmenų kūrimo reikalavimų, todėl papildomai buvo sukurti du pradmenys transgeninio intarpo sekoje, nekoduojančiame T-DNR lokuse, prie pat įsiterpimo ribos (pradmenys SBHTR1 ir TR2). Pagauginant I-PGR metodu, ilgiausi fragmentai gauti naudojant pradmenų poras SBHG1 ir SBHTR1: 3408 bp fragmentas, bei SBHG1 ir SBHTR2: 3347 bp fragmentas. 1 µL pirmojo fragmento pagausinimo produkto buvo panaudota kaip matrica pakartotinei reakcijai, 3408 bp fragmentas buvo išgrynintas iš agarozės gelio pakankama koncentracija, kad būtų galima taikyti tiesioginę „pasivaikščiojimo pradmenimis“ abipusę neapdorotų rezultatų sekoskaitos analizę. Sekoskaitos metu buvo sukurti 10 papildomų pradmenų, pagrįstų prieš tai taikytos sekoskaitos reakcijos rezultatais. Išnagrinėjus sekoskaitos rezultatus paaiškėjo, jog gauta cukrinių runkelių H7-1 transgeninio intarpo nukleotidų seka tik viena baze skyrėsi nuo duomenų bazėje esančios sekos (nr. DD417675). Mūsų pagausintoje sekoje buvo papildoma adenino bazė septynių pasikartojančių adeninų sekoje. Toks papildomos bazės atsiradimas septynių pasikartojančių bazių sekoje greičiausiai yra pagausinimo arba sekoskaitos klaida.

Kukurūzai Bt11. Du aukštos lydymosi temperatūros pradmenys sukurti vienoje transgeninio Bt11 intarpo (2 paveikslas) pusėje (11GSF3 ir F4) ir trys pradmenys kitoje pusėje (11GSR1, R2 ir R3). Taip pat abiejose transgeninio intarpo pusėse buvo sukurti žemesnės lydymosi temperatūros pradmenys: 11GSFan1 ir Fan2 vienoje pusėje; 11GSR4, FanR1 ir Ran2 kitoje pusėje. Pastarųjų pradmenų lydymosi temperatūros buvo pritaikytos transgeninio intarpo viduje esantiems pradmenims (PATR, PATF ir kt.). Tyrimo metu buvo išbandytos visi įmanomi pradmenų deriniai. Visų I-PGR rezultatas buvo aukšto molekulinio svorio „šliužė“, arba produkto susikoncentravimas agarozės gelio šulinėlyje. Tokie rezultatai parodė, jog net ir vykstant pagausinimui (amplifikacijai) nesusidaro tipinė dvigrandinė DNR, o tai lemia stabilumą agarozės gelyje. Tam, kad pasiektume rezultatų, bandėme reakciją papildyti betainu, trechaloze arba DMSO, bet reakcijos baigtis buvo vienoda ir užsibrėžto 6,5 Kb ilgio fragmento nenukopijavome. Patyrinėjus nukleotidinę seką, paaiškėjo, jog pačiame transgeninio intarpo gale (pUC19 vektoriaus nekoduojanti seka) DNR struktūra yra labai sudėtinga: daug pasikartojančių sekų, kurioms būdingos antrinės struktūros, daug vieno nukleotido pasikartojimų. Dėl to nusprendėme apeiti šią seką ir panaudojome pradmenį transgeniniame intarpe, prie pat probleminės sekos. Reakcija baigėsi sėkmingai pagauginant 5902 bp ilgio DNR fragmentą (pradmenys 11GSFan2 + PATR). Tam, kad padengtume likusią 77 bp transgeninio intarpo sekos dalį, pagausinome papildomą 1722 bp fragmentą (pradmenys PATF+11GSR4), kuris daugiausia susidengė su ilguoju fragmentu. Ilgasis fragmentas buvo klonuotas, trumpasis fragmentas buvo sukonzentruotas tiesioginei sekoskaitai. „Pasivaikščiojimo pradmenimis“ sekoskaitos metu buvo sukurti septyni nauji pradmenys. Sekoskaitos rezultatų analizė parodė, kad aštuoni nukleotidai neatitinka turimos DNR sekos. Neatitinkantys nukleotidai buvo išsibarstę po visą ~6,5 Kb seką ir todėl buvo nuspręsta, jog tai yra pagausinimo arba sekoskaitos klaidos.



2 paveikslas. Transgeninių intarpų sandara: (A) cukrinių runkelių H7-1; (B) kukurūzų Bt11; (C) kukurūzų MON810. P-FMV – bervidžių mozaikos viruso 35S promotorius; *ctp2* – chloroplasto tranzito peptidų seka iš *Arabidopsis thaliana epsps* geno; CP4 *epsps* – 5-enolpiruvilšikimato-3-fosfato sintazės (EPSP sintazės) genas iš *A. tumefaciens* padermės CP4; E9 3' – transkripcijos nutraukimo ir poliadenilinimo signalo sekos iš ribuliozės-1,5-bifosfatokarboksilazės mažą subvienetą (*rbcS*) E9 koduojančio geno žirnyje (*Pisum sativum*); LB – Kairiosios Ribos seka iš *A. tumefaciens*; P-35S – žiedinių kopūstų mozaikos viruso 35S promotorius; IVS2 ir IVS 6 – intronai 2 ir 6 iš kukurūzų alkoholio dehidrogenazės geno; *cryIA(b)* – genas, koduojantis Cry1Ab delta-endotoksiną (Btk HD-1) (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk)); nosT – *A. tumefaciens* nopalino sintazės (*nos*) 3'-netransliuojamas regionas, kuris veikia kaip terminatorius; *pat* – fosfinotricino N-acetiltransferazė (*S. viridochromogenes*); *hsp70* – karščio indukuojamo stipriklio fragmentas iš karščio šoko baltymo 70 geno.

2. Anglies nanovamzdeliai (ANV): potencialus I-PGR stipriklis

I-PGR tyrimai bandant nukopijuoti ir pagausinti ilgą DNR fragmentą, kuriame būtų visi transgeninio intarpo elementai, parodė, jog šis metodas yra labai jautrus. Literatūroje aprašyta daugybė PGR priedų, kurie veikia reakcijos specifiškumą, išeigą, stabilumą, atskirų elementų veikimą ir kt. Pirminis ANV tyrimo tikslas buvo ištirti šias nanodaleles kaip PGR specifiškumą ir reakcijos veiksmingumą didinantį priedą. Kadangi literatūroje ANV kaip PGR reakcijos priedas yra labai menkai aprašytas, pirminiu šaltiniu tapo Zhang *et al.* (2008) mokslinis straipsnis, kuriame pristatomas ANV potencialas sumažinti aukštos molekulinės masės „šliužės“ ir sukoncentruoti DNR fragmentą agarozės gelyje. Atlikę eksperimentinio darbo, aprašyto minėtame straipsnyje, pakartojimus, gavome visiškai skirtingus rezultatus nei autoriai. Naudojant daugiasienių ANV nuo 0,4 iki 1,6 μg/μl koncentracijas, reakcijų specifiškumas mažėjo, vyko reakcijos slopinimas. Kontrolinės reakcijos taip pat neatitiko aprašytųjų: atkartodami 14 Kb pagausinimo reakciją, mes pastebėjome gerai sukoncentruotą DNR fragmentą, nors mokslinio tyrimo autoriai aprašė aukštos molekulinės masės „šliužę“.

Nors daugiasieniai ANV (dsANV) nepadėjo ir anksčiau aprašytų nepavykusių Bt11 I-PGR, kai kuriuose eksperimentuose, naudodami Lambda DNR molekulinį standartą, pastebėjome, kad, įdėjus šiek tiek ANV, agarozės gelyje plika akimi pastebimai padidėjo

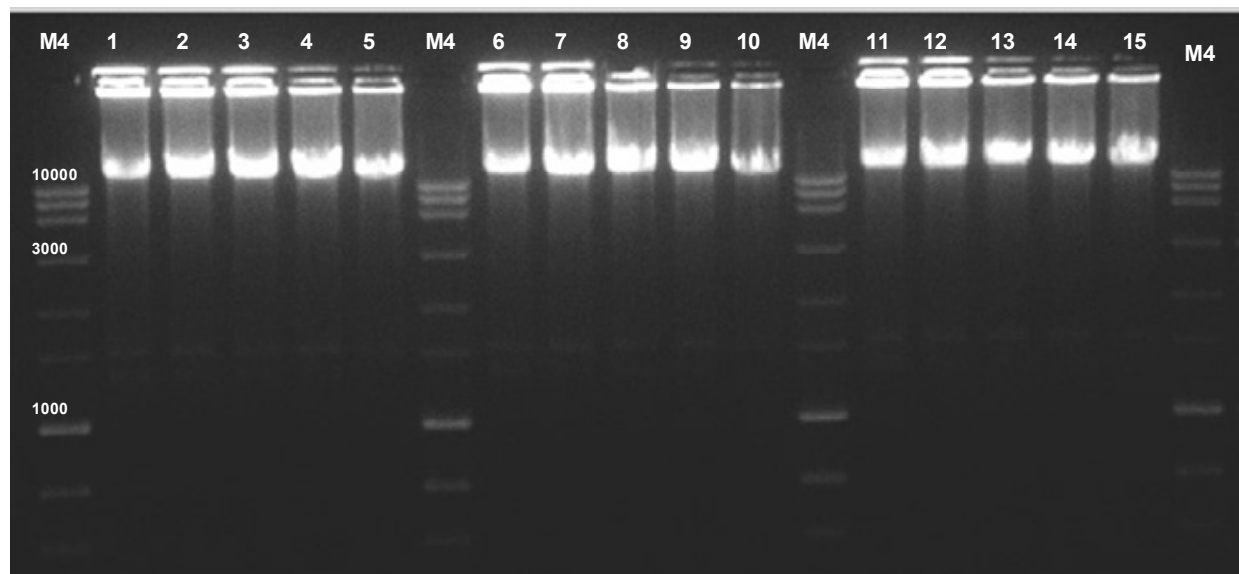
reakcijos produkto kiekis. Taigi, I-PGR reakcijos specifiškumo tyrimas baigtas be teigiamų rezultatų, bet pastebėtas produkto pagausėjimas naudojant daugiasienius ANV be funkcinės grupės, disperguotus vandenyje, kai reakcijoje buvo 0,2–0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ galutinė nanodalelių koncentracija. Pastebėtas ir reakcijos išeigos padidėjimas naudojant daugiasienius ANV be funkcinės grupės, disperguotus 100 % DMSO tirpale, kai reakcijoje buvo 0,2–0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ galutinė nanodalelių koncentracija; taip pat 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ daugiasienių ANV su funkcinė hidroksilo grupe ir 0,2–0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ daugiasienių ANV su funkcinė amido grupe (daugiau duomenų pateikta 1 lentelėje ir 3 paveiksle). Dėl itin sudėtingo ANV paruošimo tyrimams visi eksperimentai buvo pakartoti mažiausiai tris kartus. Tokiu būdu buvo atmetamas galimas netinkamų ANV dispersijų panaudojimas (pvz., ANV formuoja aglomeratus, manoma, praėjus vos 30 minučių po poveikio stiprių ultragarsu).

1 lentelė. Produkto kiekio kitimas reakcijose su daugiasieniais (ds) ANV, taikant I-PGR metodą Phusion DNR polimerazė + dsANV, disperguoti vandenyje

dsANV be funkcinės grupės	Produkto koncentracijos padidėjimas su Cf 0,2–0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
dsANV-OH	Nepastovus slopinimas
dsANV-NH ₂	Laipsninis slopinimas

Taq ir *Tgo* DNR polimerazės + dsANV, disperguoti DMSO

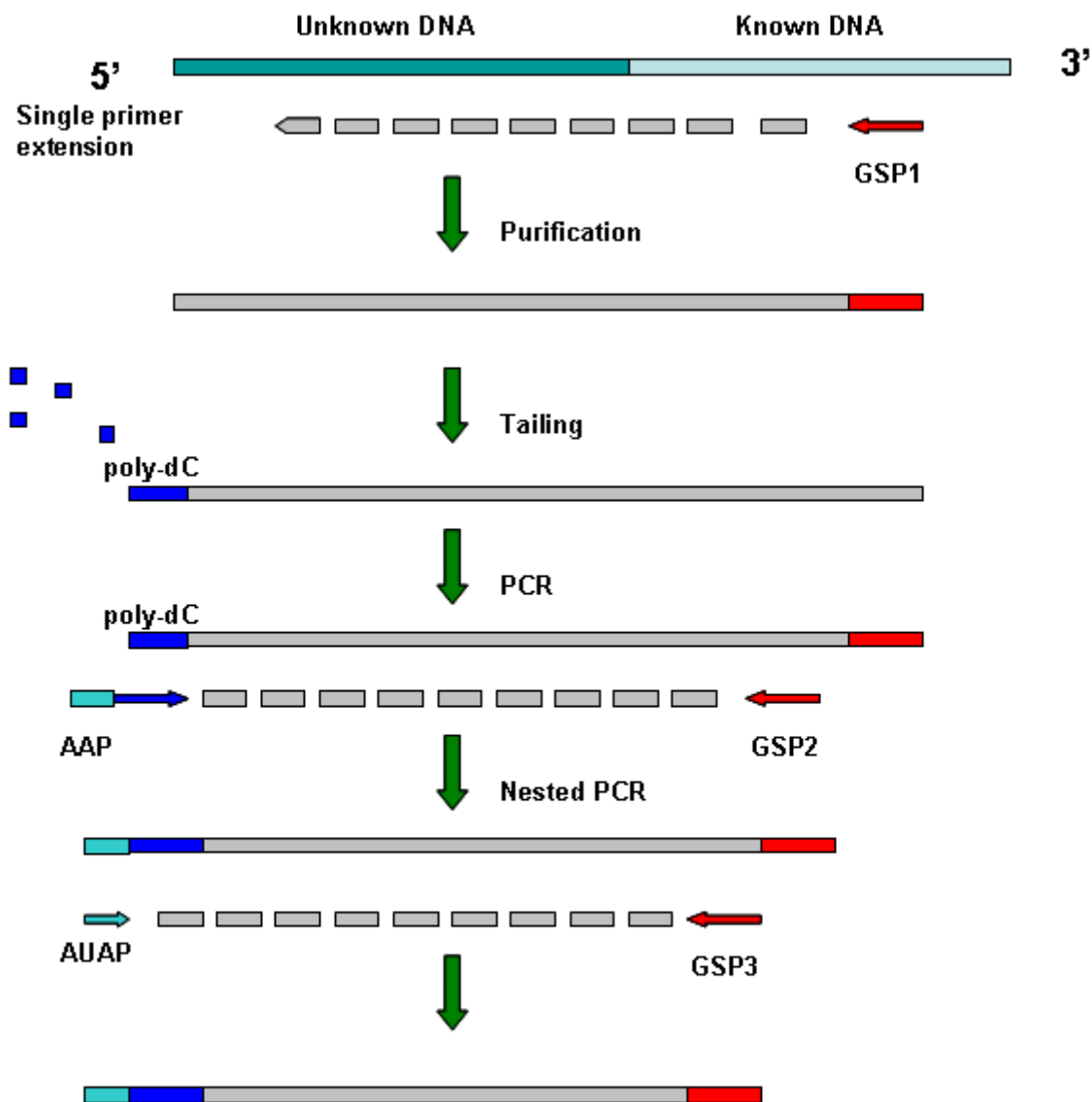
dsANV be funkcinės grupės	Produkto koncentracijos padidėjimas su Cf 0,2–0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
dsANV-OH	Produkto koncentracijos padidėjimas su Cf 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
dsANV-NH ₂	Produkto koncentracijos padidėjimas su Cf 0,2–0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$



3 paveikslas. 100 % DMSO disperguotų dsANV poveikis I-PGR reakcijai, pagausinant 14 Kb lambda DNR fragmentą *Taq* ir *Tgo* polimerazių mišiniu. 1,6 ir 11 juostos yra kontrolinės reakcijos be priedų; 2, 7 ir 12 juostos yra kontrolinės reakcijos be dsANV, bet su 2 % DMSO; 3, 4 ir 5 juostos– reakcijos su atitinkamai 0,2, 0,4 ir 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dsANV be funkcinės grupės; 8, 9 ir 10 juostos– reakcijos su atitinkamai 0,2, 0,4 ir 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dsANV-OH; 13, 14 ir 15 juostos– reakcijos su atitinkamai 0,2, 0,4 ir 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dsANV-NH₂. M4– molekulių masių standartas MassRuler™ Express Forward DNA Ladder Mix.

3. LT-RADE: nuo DNR karpymo nepriklausomas adapterinis „pasivaikščiojimo genomu“ metodas

RADE metodas (pažodžiui „greitas genomines DNR galų pagausinimas“, angl. *Rapid Amplification of Genomic DNA Ends*) ir metodo atmaina LT-RADE (ilgagrandinis RADE) buvo sukurtas kaip pagrindą naudojant jau egzistuojančius metodus bei rinkoje esamas medžiagas. Pirminis RADE kūrimas ir optimalių reakcijų sąlygų ieškojimas buvo atliekami naudojant 100 % kukurūzų MON810 augalų lapų DNR ir 100 % sėjamųjų ryžių LLRICE62 augalų lapų DNR. Abiem atvejais PG buvo pradamas nuo abiejų transgeninio intarpo galų ir nukreiptas į nežinomas augalo DNR sekas aplink transgeninio intarpo įsiterpimo vietas. Kuriant PG metodą pastebėta, jog naudojant vien *Taq* polimerazę gauti fragmentai beveik dvigubai trumpesni nei naudojant *Taq+Tgo* (kukurūzų MON810, 5': *Taq* 577 bp, *Taq+Tgo* 1018 bp. 3': *Taq* 564 bp, *Taq+Tgo* 855 bp; 2 lentelė). Dėl to, priklausomai nuo eksperimento PGR žingsniuose naudojamos polimerazės, PG metodą išskyrėme į RADE ir LT-RADE metodus. Trumpas metodo RADE žingsnių aprašas pateikiamas metodų skyriuje ir 4 paveiksle.



4 paveikslas. RADE ir LT-RADE metodų schema. Procedūra pradedama pailginant vieną pradmenį nuo žinomos sekos į nežinomą DNR seką ir gaunant pagausintą viengrandinį DNR fragmentą. Fragmentas išgryninamas ir naudojant terminalinę deoksinukleotidiltransferazę prijungiama poli-dC „uodega“. Tolesni metodo žingsniai yra lizdinės adapterinės PGR (ar I-PGR) naudojant AAP adapterio ir AUAP universalų adapterio pagausinimo pradmenis. GSP 1,2,3 – genui specifiški pradmenys (žinomoje DNR sekoje).

2 lentelė. DNR fragmentų ilgiai, RADE (*Taq*) ir LT-RADE (*Taq+Tgo*) testuojant su kukurūzų MON810 augalo lapų DNR

	<i>Taq</i>	<i>Taq + Tgo</i>
5' sekos gale nukopijuotas DNR fragmentas	577 bp	1018 bp
3' sekos gale nukopijuotas DNR fragmentas	564 bp	855 bp

Testuodami LT-RADE metoda ir analizuodami geriausias sąlygas reakcijų sėkmei ir išeigai, sėkmingai nukopijavome ir pagausinome, taip pat atlikome sekoskaitą tokio ilgio DNR fragmentams: kukurūzų MON810, nukleotidinės sekos 5' gale pagausinome 1018 bp, o 3' gale– 855 bp fragmentą; sėjamųjų ryžių LLRICE62 nukleotidinės sekos 5' gale pagausinome 629 bp, o 3' gale– 335 bp fragmentą. Sekos buvo palygintos panašumų analizės būdu (BLAST), taip pat su informacija, kuri pateikta atskirų GMO kūrėjų patentuose (jei yra). 1018bp sekos, kurią nukopijavome kukurūzų MON810 transgeninio intarpo 5' nukleotidinės sekos gale, palyginys rodė 87 % panašumą į kukurūzų DNR BAC kloną ZMMBBb0448F23. Nustatyta 139 bp seka, kuri prieš tai nebuvo publikuota kaip kukurūzų DNR seka, esanti prie transgeninio MON810 intarpo (5 paveikslas). 855 bp seka, nukopijuota kukurūzų MON810 transgeninio intarpo 3' nukleotidinės sekos gale, 100 % atitiko jau publikuotą MON810 3' sintetinės DNR įsiterpimo vietą. Palyginių rezultatai pateikiami 3 lentelėje. Kadangi iki šiol visuomenei prieinamoje informacijoje yra tik spekuliuojama, jog MON810 transgeninis intarpas yra augalo 5-oje chromosomoje, manome, kad daugiau informacijos padėtų konkrečiai nustatyti transgeninio intarpo lokalizaciją. Paskelbti moksliniai duomenys patvirtina, jog į MON810 įsiterpus rekombinantinei DNR, toje augalo genomo vietoje vyko didelės pertvarkos.

3 lentelė. MON810 nukopijuotų sekų palyginiai

		Užklausos aprėptis (nt)	Užklausos aprėptis	Maksimalus panašumas	E reikšmė
MON810					
5'	Genomic sequence for <i>Zea mays</i> BAC clone ZMMBBb0448F23, complete sequence (sekos numeris AC160211)	1-935	91%	87%	0,0
	Synthetic construct transgenic <i>Zea mays</i> with Cauliflower mosaic virus genomic sequence (sekos numeris AF434709)	936-1018	9%	100%	2e-35
3'	<i>Zea mays</i> 3' insertion site between truncated cryI(A)b transgene and Zm-upI gene, isolate fragment 1 (sekos numeris AM749998)	1-855	100%	100%	0,0

BAC_ZMMBBb0448F23
139_bp

TGAGTCATCTTCGGAAATGTTGA-AAATGTGCTCTTAAGGCCGAAGCT--AAAAATCTAA
TGAGACATCTTCGGAAATGCTGACAAAAGTCTCTCAAAGCCGAAGCTTAAAAATCTAA

BAC_ZMMBBb0448F23
139_bp

AAAGCCAGGCAAGCGTTGGTATGCAAGAGCTAAAAATTGGGAAAGCAAGAGCAGATGGCG
AAAGCCAAGCAAATGTTGGTGCAGCAAGAGCTGAAAATTGAGTAAGAAAGAGCAGATGGCA

BAC_ZMMBBb0448F23
139_bp

AGAAAGCGTGCCAAATGAG
AGAAAGCGTGCCAAATGAG

5 paveikslas. 139 bp sekos, nustatytos už 5' transgeninio intarpo pusėje esančioje augalo genomo dalyje, palyginys. MON810 seka iš dalies atitinka BAC kloną ZMMBBb0448F23 (duomenų bazės sekos numeris AC160211) seką.

629 bp sekos, nukopijuotos sėjamųjų ryžių LLRICE62 transgeninio intarpo 5' nukleotidinės sekos gale, palyginys rodė 99 % panašumą į ryžių BAC kloną OSJNBa0029G06 (216 bp) ir 100 % panašumą į binarinį vektorių (407 bp), kuriame klonuota transgeninė seka. 335 bp seka, nukopijuota sėjamųjų ryžių transgeninio intarpo 3' nukleotidinės sekos gale, 100 % atitiko sojų transgeninio intarpo seką (109 bp) ir ryžių BAC kloną OSJNBa0029G06 seką (226 bp). Palyginių rezultatai pateikiami 4 lentelėje. Kadangi sėjamųjų ryžių LLRICE62 seka iki mūsų tyrimų pabaigos nebuvo viešai publikuota, visos šio GMO transgeninio intarpo sekos yra naujai aptiktos, bet dėl intarpo konstrukcijos gali atitikti kitų transgeninių augalų sintetinės DNR sekas, kaip tai pastebėta su ryžių intarpo 3' nukleotidinės sekos gale nukopijuotu fragmentu. Kadangi abiejose transgeninio fragmento pusėse aptikome panašumą į BAC kloną OSJNBa0029G06, iš savo sekų eliminavome transgeninės sekos likučius ir sujungėme nukopijuotus ryžių genominės DNR fragmentus. Iš sėjamųjų ryžių LLRICE62 patento dokumento buvo aišku, jog transgeninis intarpas, inkorporacijos metu paliko 18 bp iškritą. Tokio dydžio iškritą pastebėjome palyginę minėtą BAC kloną su ryžių genomo seka ir nukopijuotų transgeninių ryžių genomo sekų galus (6 paveikslas).

4 lentelė. LLRICE62 nukopijuotų sekų palyginiai

		Užklausos aprėptis (nt)	Užklausos aprėptis	Maksimalus panašumas	E reikšmė
LLRICE62					
5'	<i>Oryza Sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 6, BAC clone: OSJNBa0029G06 (sekos numeris AP004680)	5-221	34%	99%	4e-106
	Binary vector BinHygTOp aph, tetA, tetR, traJ, insB, insA, aphA-3 and trfA genes (sekos numeris Z37515)	222-629	64%	100%	0,0
3'	<i>Glycine max</i> transgenic GMO cassette genomic sequence (sekos numeris GQ497217)	1-109	29%	100%	1e-48
	<i>Oryza Sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 6, BAC clone: OSJNBa0029G06 (sekos numeris AP004680)	108-374	71%	100%	2e-136

```

BAC_OSJNBa0029G06      GCATGTGAGACAAAGAGTGAAGAAGAGAGAGGAAGAGTGAGAGAGAGAAGTGAATATG 60
study_results          GCATGTGAGACAAAGAGTGAAGAAGAGAGAGGAAGAGTGAGAGAGAGAAGTGAATATG 60
*****

BAC_OSJNBa0029G06      AGTATGACATGTGGGCTCCATATTTTTTAATAAATAAAATGCTGACTGGACCGCCACCGT 120
study_results          AGTATGACATGTGGGCTCCATATTTTTTAATAAATAAAATGCTGACTGGACCGCCACCGT 120
*****

BAC_OSJNBa0029G06      ACGCCACGTAGACCAAAACCACCGCAGATTAGGTCGAGGGGGGTAATTTGTCGGTTTGC 180
study_results          ACGCCACGTAGACCAAAACCACCGCAGATTAGGTCGAGGGGGGTAATTTGTCGGTTTGC 180
*****

BAC_OSJNBa0029G06      ATAGTTGGGGTGAAGAATGCCCGATTTTGTGGTTTAGGGGGGTAATTCGGACAACCGC 240
study_results          ATAGTTGGGGTGAAGAATGCCCGATTTTGTGGTTTAGGGGGGTAATTCGGACAACCGC 240
*****

BAC_OSJNBa0029G06      GATAGTTCGGGGTAATAGTACTTTTTCCCTATATTTATGACTATTATACTTTTAGTC 300
study_results          GATAGTTCGGGGTAATAGTACTTTT-----ATTTACTTTTAGTC 282
*****

BAC_OSJNBa0029G06      CACCTGGTTTTATTGATAGACGATGCACCCGTTAGCAGTAAGACATCGCTAAATCTTTG 360
study_results          CACCTGGTTTTATTGATAGACGATGCACCCGTTAGCAGTAAGACATCGCTAAATCTTTG 342
*****

BAC_OSJNBa0029G06      GAAGTAGTGTGCGTGTACATACATATGCGACATATTTCTAAGATCTTTGTTTT 420
study_results          GAAGTAGTGTGCGTGTACATACATATGCGACATATTTCTAAGATCTTTGTTTT 402
*****

BAC_OSJNBa0029G06      AAGAAAAACCAACTTCTACAACAACGAATTAGTTTTGAGATTGTTGTTGGAGGGAC 480
study_results          AAGAAAAACCAACTTCTACAACAACGAATTAGTTTTGAGATTGTTGTTGGAGGGAC 462
*****

BAC_OSJNBa0029G06      CGTAGTCGCCGTTGCTTCCGG 501
study_results          CGTAGTCGCCGTTGCTTCCG- 482
*****

```

6 paveikslas. Sėjamųjų ryžių LLRICE62 transgeninio intarpo įsiterpimo vietos (pažymėta „study_results“) ir BAC klonu OSJNBa0029G06 palyginys. Vietoje, kur transgeninių ryžių sekoje įsiterpia transgeninis intarpas, matoma patente aprašyta 18 bp iškrita.

4. LT-RADE pritaikymas GMO tyrimams

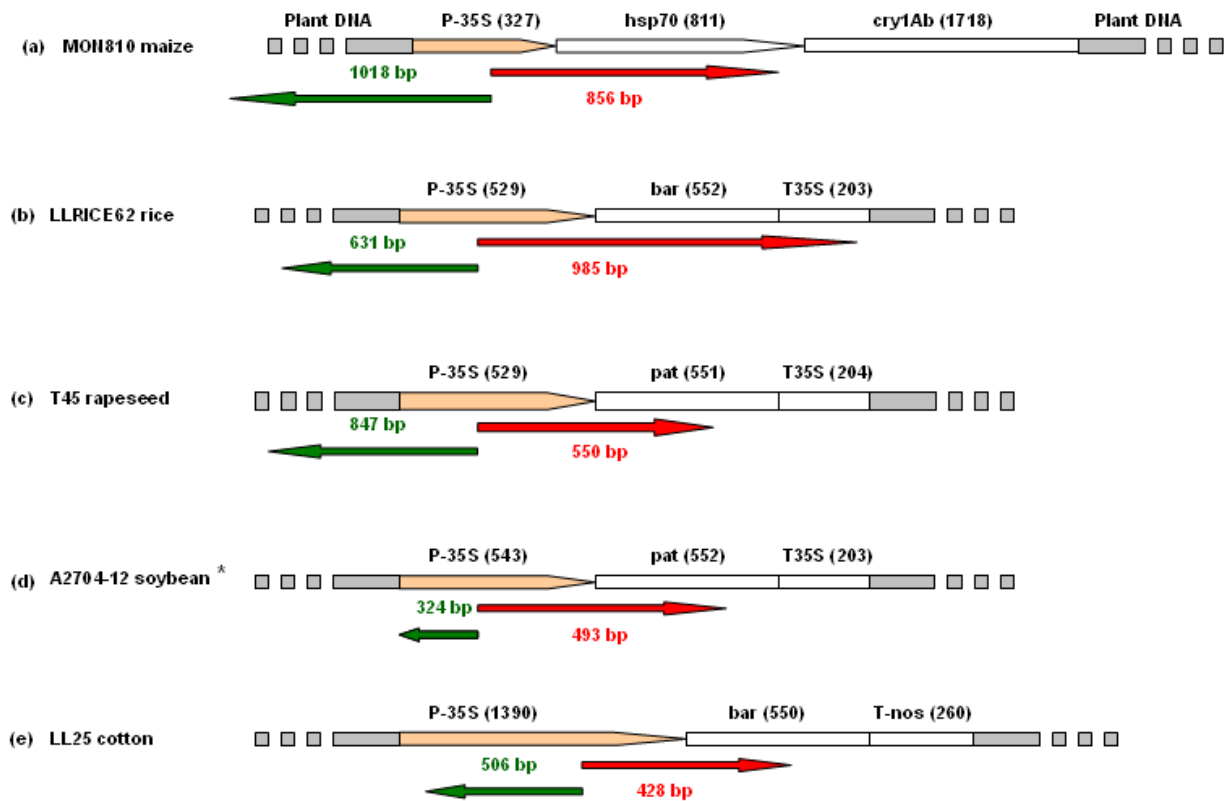
Sėkmingai sukūrus ir optimizavus LT-RADE metodą, atsirado poreikis jį išbandyti papildomai: naudojant kitų GMO DNR matricas, taip pat reakcijas nukreipiant į kitą pusę nuo P-35S, t. y. į transgeninio intarpo vidų. Kaip atvirkštinės reakcijos modelį pasirinkome tas pačias DNR matricas: 100 % kukurūzų MON810 augalo lapų DNR ir 100 % sėjamųjų ryžių LLRICE62 augalo lapų DNR. Papildomai reakcijoms į abi puses pasirinkome šias DNR matricas: 100 % T45 rapsų augalų lapų DNR, 100 % A2704-12 sojų augalų lapų DNR ir 100 % LLCOTTON25 vilnamedžių augalų lapų DNR. Tam, kad įsitikintume mūsų sukurtų pradmenų unikalumu, reakcijoms, nukreiptoms į transgeninio intarpo DNR, pradmenų nemodifikavome, o tiesiog apšukome kita linkme. Taip pat kiekviena reakcija buvo vykdoma su skirtingu DNR matricos kiekiu pradinėje reakcijoje. Gautų fragmentų ilgiai pateikiami 5 lentelėje ir 7 paveiksle.

5 lentelė. „Pasroviui“ ir „prieš srovę“ pritaikyto LT-RADE nukopijuoti ilgiausi DNR fragmentai

	Transgeninio intarpo sandara	Apytikslis geno dydis, Mb	Ilgiausias nukopijuotas DNR fragmentas, bp		Pradinė DNR koncentracija, ng/rxn
			„Pasroviui“ (į transgeninį intarpą)*	„Prieš srovę“ (į augalo genomą)*	
Kukurūzai MON810	P35S- <i>hsp70-cryIAb</i>	2500	856	1018	500
Sėjamieji ryžiai LLRICE62	P35S- <i>bar-T35S</i>	430	985	631	200
Rapsai	P35S- <i>pat-T35S</i>	1200	551	847	400

T45					
Sojos A2704-12	P35S- <i>pat</i> -T35S (2X)	1115	493	324	300
Vilnamedžia LLCOTTO N25	P35S- <i>bar</i> -Tnos	2500	428	506	300

* Kadangi GSP1 ir GSP3 veikia kaip pirminis arba galutinis pradmuo, priklausomai nuo „pasivaikščiojimo“ krypties, tarp gautų sekų „pasroviui“ ir „prieš srovę“ yra 60 bp tarpas.



7 paveikslas. DNR fragmentai, kurie buvo izoliuoti ir padauginti taikant LT-RADE metodą ant penkių skirtingų GMO DNR matricių. Rodyklės rodo „pasivaikščiojimo“ kryptį, prie rodyklės nurodytas fragmento ilgis (bp). Tyrimas atliktas su: (a) kukurūzais MON810; (b) sėjamaisiais ryžiais LLRICE62; (c) rapsais T45; (d) sojomis A2704-12; (e) vilnamedžiais LL25COTTON. * sojos A2704-12 turi du identiškus labai arti vienas kito transgeninius intarpus.

Reakcijos „prieš srovę“ (nukreiptos į augalo genomo DNR). Be minėtų MON810 ir LLRICE62, kurių izoliuotos „prieš srovę“ sekos jau aprašytos, 847 bp rapsų T45 seka 99 % atitiko jau aprašytą T45 seką, 324 bp sojų A2704-12 seka buvo 99 % identiška jau aprašytai transgeninių sojų sekai. 505 bp vilnamedžių LLCOTTON25 seka– 100 % identiška aprašytai LLCOTTON25 sekai. Visų sekų palyginiai pateikiami 6 lentelėje.

Reakcijos „pasroviui“ (nukreiptos į transgeninį intarpą). Šios reakcijos buvo taikomos ir kukurūzams MON810, ir sėjamiesiems ryžiams LLRICE62, nes kuriant LT-RADE metodą ir optimizuojant reakcijas, reakcijos „pasroviui“ buvo vykdomos kitoje transgeninio intarpo pusėje, nei yra promotorius P-35S. 856 bp kukurūzų MON810 seka 99 % atitiko publikuotą sutrumpinto *cry1A(b)* geno dalinę seką. 985 bp ryžių LLRICE62

seka 96 % atitiko binarinį vektorių pLH7500, kuris turi panašią į šių transgeninių ryžių intarpo seką. Paieškos rezultatus filtruojant tik *Oryza sativa* rūšiai, jokių rezultatų nerasta. Rapsų T45 551 bp seka po palyginimo analizės 99 % atitiko transgeninių kukurūzų DNR. Paieškoje filtruojant tik pagal rūšies pavadinimą (*Brassica napus*), jokių rezultatų nerasta. 493 bp sojų A2704-12 seka buvo 100 % identiška jau aprašytai transgeninių sojų sekai, o 428 bp vilnamedžių LLCOTTON25 seka –99 % identiška aprašytai LLCOTTON25 sekai.

6 lentelė. Nukopijuotų fragmentų nuo P-35S į abi sekos puses palyginiai

LT-RADE kryptis	Fragmento ilgis	GMO, naudotas kaip matrica ir palyginiai	Užklausos aprėptis	Maksimalus panašumas
Kukurūzai MON810				
„pasroviui“	856	Synthetic construct truncated CRYIA(b) (cryIA(b)) gene, partial CDS (sekos numeris AY326434)	100 %	99 %
„prieš srovę“	1081	Synthetic construct transgenic <i>Zea mays</i> with Cauliflower mosaic virus genomic sequence (sekos numeris AF434709)	86 %	99 %
Sėjami ryžiai LLRICE62				
„pasroviui“	985	Binary vector pLH7500, complete sequence. (sekos numeris AY234331)	100 %	96 %
„prieš srovę“	631	<i>Oryza Sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 6, BAC clone: OSJNBa0029G06 (sekos numeris AP004680) ir Binary vector BinHygT ^{Op} aph, tetA, tetR, traJ, insB, insA, aphA-3 and trfA genes (sekos numeris Z37515)	98 %	100 %
Rapsai T45				
„pasroviui“	551	<i>Zea mays</i> transgenic phosphinothricin acetyltransferase gene, partial CDS; ir beta lactamase and phosphinothricin acetyltransferase genes, complete CDS (sekos numeris DQ156557)	100 %	99 %
„prieš srovę“	847	<i>Brassica napus</i> transgenic line T45 left border junction of transgenic event genomic sequence (sekos numeris FJ154954)	92 %	99 %
Sojos A2704-12				
„pasroviui“	493	<i>Glycine max</i> transgenic GMO cassette genomic sequence (sekos numeris GQ497217)	100 %	100 %
„prieš srovę“	324	<i>Glycine max</i> transgenic GMO cassette genomic sequence (sekos numeris GQ497217)	100 %	99 %
Vilnamedžiai LLCOTTON25				
„pasroviui“	428	<i>Gossypium hirsutum</i> transgenic clone LLCotton25 phosphinothricin N-acetyltransferase gene, complete CDS (sekos numeris HQ233646)	100 %	99 %
„prieš srovę“	505	<i>Gossypium hirsutum</i> transgenic clone LLCotton25 phosphinothricin N-acetyltransferase gene, complete CDS (sekos numeris HQ233646)	100 %	100 %

Dvi iš gautų sekų (dalinė LLRICE62 koduojanti seka ir T45 transgeninio intarpo seka) nebuvo publikuotos viešosiose duomenų bazėse, nors izoliuotos sekos buvo panašios į kitų transgeninių augalų, turinčių panašią transgeninio intarpo sandarą. Mūsų publikuotose sekose sėjamųjų ryžių LLRICE62 sekoje aiškiai išskirti atskiri elementai: dalis P-35S promotoriaus, *bar* genas ir T-35S terminatorius. Rapsų T45 publikuota seka yra P-35S promotoriaus ir *pat* geno jungtis (P-35S---*pat*).

IŠVADOS

1. 3408 bp ir 5902 bp ilgio DNR fragmentai su beveik visais transgeniniais GMO intarpais buvo nukopijuoti ir pagausinti; jų integralumas patvirtintas „pasivaikščiojimo pradmenimis“ sekoskaitos metodu.
2. Anglies nanovamzdeliai neigiamai veikia I-PGR stabilumą ir specifiškumą; nedideli anglies nanovamzdelių kiekiai padidina gaunamo I-PGR produkto koncentraciją.
3. Sukurtas „pasivaikščiojimo genomu“ metodas RADE ir patobulinta metodo versija LT-RADE tam, kad būtų galima aptikti nežinomas augalo genomo DNR sekas, supančias transgeninius GMO intarpus; optimizuotos LT-RADE sąlygos, kad metodą būtų galima taikyti rutiniškai.
4. Kuriant ir optimizuojant „pasivaikščiojimo genomu“ metodą, sukurti du universalių pradmenų rinkiniai, pritaikyti pradėti LT-RADE reakcijas nuo P-35S promotoriaus.
5. LT-RADE metodas sėkmingai išbandytas dviem kryptimis (nukreiptomis į transgeninį intarpą ir augalo genomo DNR) penkioms skirtingoms transgeninių augalų rūšims.

MOKSLINIAI STRAIPSNIAI DISERTACIJOS TEMA

1. Spalinskas R, Van den Bulcke M, Van den Eede G, Milcamps A. 2012. LT-RADE: An Efficient User-Friendly Genome Walking Method Applied to the Molecular Characterization of the Insertion Site of Genetically Modified Maize MON810 and Rice LLRICE62. *Food Analytical Methods* 6(2): 705–13. doi: 10.1007/s12161-012-9438-y
2. Spalinskas R, Van den Bulcke M, Milcamps A. 2013. Efficient retrieval of recombinant sequences of GM plants by Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter-based bidirectional LT-RADE. *European Food Research and Technology* 237(6): 1025–31. doi: 10.1007/s00217-013-2078-7

ABSTRACT

One of the fastest developing fields of biotechnology in the past three decades is that of genetically modified (GM) plants for industrial applications, as well as food and feed. The European Union (EU) has probably the most rigorous regulations for GMOs in the world and as such, the decisions made by the EU political structures on regulatory and marketing actions heavily depend on scientific evidence. This doctoral dissertation deals with the molecular biology laboratory methods based on the most popular to date method polymerase chain reaction (PCR) used in the molecular characterization of the genetically modified organisms (GMOs). When studying the molecular structure of the GMO, two main interests of the nucleotide sequence are the actual sequence of the transgenic insert and the plant genomic DNA surrounding the synthetic DNA. The analytical approach on both of these sequences of interest are analyzed within the pages of this thesis.

The long template PCR (or LT-PCR) is a method which enables the isolation of long and uninterrupted DNA fragments while carrying out a slightly modified PCR reaction. In this study we have successfully demonstrated that this method may be used for isolation of the fragments that contain nearly full transgenic inserts. This was demonstrated on the H7-1 sugar beet, Bt11 maize and MON810 maize GM events. A fragment of 3408 bp spanning from the 5' flanking plant genomic DNA to the T-DNA at the very end of transgenic insert was isolated for the H7-1 sugar beet using the primer pair SBHG1 & SBHTR1. Two overlapping fragments of 5902 bp and 1722 bp were obtained respectively with the primer pairs 11GSFan2 + PATR and PATF+11GSR4 for Bt11 maize transgenic insert. The fragment of 5902 bp was missing 77 bp of the total length of the full transgenic insert because of the difficult template constitution at the end of the sequence. The missing sequence was obtained by an overlapping fragment. A full transgenic insert was amplified successfully for MON810 maize. Four primer combinations of primers located in the 5' and 3' plant genomic DNA have produced the fragments which were visualized on the agarose gels. Primer Walking sequencing reactions have further ensured the integrity of the obtained transgenic insert in a single uninterrupted DNA fragment. During the analysis of the LT-PCR method and its application to retrieve full transgenic inserts of the GMOs, it was noticed that in some cases the sensitivity of such reactions may lead to unfavorable results such as smearing on the agarose gel, insufficient or no product and other failures of the reactions. An enhancement of the LT-PCR was therefore considered in the form of additives put into the reaction mixtures. As most of the PCR additives have well described application patterns, for the purpose of scientific novelty, the study was performed with the novel material and a potential PCR additive, carbon nanotubes (CNTs), a nanomaterial. Multi Walled CNTs (or MWCNTs) were tested for the specificity and efficiency enhancement of the LT-PCR, however no such effect was noticed. Furthermore, the physicochemical properties of the CNTs have shown a very difficult mode of the application of the CNTs in the molecular biology methods. However, after examining the results of the CNT application a non-significant increase in the product yield was noticed. Particularly, the experiments with the MWCNTs solubilized in water and using the Phusion High-Fidelity DNA polymerase, the final concentrations of 0.2-0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of non functionalized (nude) MWCNTs in the reaction have resulted in yield increase. When using the MWCNTs

solubilized in DMSO and the blend of *Taq+Tgo* DNA polymerases, the same yield increase was observed with the non functionalized MWCNTs and additionally the final concentration of 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of MWCNT-OH and the final concentrations of 0.2-0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of MWCNT-NH₂ have as well showed the LT-PCR product yield increase. All the above mentioned yield increase cases were observed when amplifying an uninterrupted lambda DNA fragment of 14 kb in length. As such, it was found out that the low concentration of the CNTs may increase the productivity of the LT-PCR, but not the specificity. At the very end of the investigation of carbon nanotubes as a potential enhancer to PCR we have concluded that the benefit ratio against the difficulties of the preparation and application of the material is very unfavorable.

One of the objectives of the long range PCR technique application on the GMOs was the test of the impact of the different DNA quality and quantity for the reaction. Three sources were selected for DNA extractions: the plant leaves which proved to produce the highest quality DNA; the ground seeds which produced somewhat good quality DNA samples; and Certified Reference Material (CRM) which produced the lower quality DNA samples with visibly fragmented DNA or smearing along the agarose gel. CRM also had a different GM contents (percentage) as pre-selected. The H7-1 sugar beet experiments on 100% GM contents CRM DNA have shown the positive outcome of the LT-PCR on the lower quality DNA which may be advantageous when using the lower quality DNA in emergency situations or cases when better sample quality is not available. The Bt11 ground seed DNA also proved to be of sufficient quality to obtain long uninterrupted transgenic insert fragments via the long range PCR. Lastly, we have successfully isolated the entire MON810 maize transgenic insert in one fragment using the 5% GM contents CRM. Such observations suggest the good potential of the method of LT-PCR when having less than good or perfect DNA quality and/or lower GM content in the source of DNA.

The Genome Walking is a technique to obtain unknown DNA fragments adjacent to the known DNA. This doctoral dissertation seeks to explain in detail the development and optimization of a method of genome walking to have it applied on the GMO DNA matrices. A method Rapid Amplification of gDNA Ends (RADE) and its modified version (fused with LT-PCR) entitled Long Template RADE (or LT-RADE) was developed and the method conditions were optimized on the plant leaf tissue DNA of the MON810 maize. While fusing the RADE method with the LT-PCR, we have noticed the improvement in DNA fragment length particularly the 577 bp DNA fragment amplified by *Taq* polymerase in 5' plant flanking DNA region has extended to the 1018 bp fragment when using the *Taq+Tgo* blend. The fragment in the 3' plant flanking DNA region has increased in size accordingly from 564 bp to 855 bp. Such fragment sizes when applying the genome walking methods tend to be very informative and sufficient. 139 bp of the full 1018 bp fragment on the 5' plant flanking DNA was newly described and associated with the MON810 transgenic DNA insertion site. The method was then successfully additionally tested on the LLRICE62 rice GM event, obtaining the aimed sequences of the junction regions of the transgenic insert and the plant genomic DNA. Two fragments of 629 bp on the 5' plant flanking DNA and 335 bp on the 3' plant flanking DNA were obtained, isolated and described. After connecting the obtained plant DNA from both insertion site sides, and performing the alignment analysis, we have

noticed the 18 bp deletion of the rice plant DNA in the insertion site (6th chromosome) exactly as it is described in the patent of LLRICE62.

After the development and optimization of the LT-RADE, the study to prove the robustness and feasibility was carried out. In this study, the strong unique primer set of P-35S promoter of Cauliflower Mosaic Virus which proved to work on previous matrices, was also reversed to perform the bidirectional genome walking. This was done due to the fact that P-35S is one of the most commonly used promoters for chimeric gene constructs designed for expression in plant cells. A set of five different species of the plants and their transgenic varieties were selected for the application study of the LT-RADE. Those were the aforementioned MON810 maize and LLRICE62 rice, as well as the T45 rapeseed, A2704-12 soybean and LLCOTTON25 cotton. These organisms have varied genome sizes from 430 Mb (rice) to approx 2500 Mb (maize and cotton), thus different starting DNA quantities were used in the genome walking reactions. All bidirectional reactions have concluded successfully obtaining the aimed DNA sequences of which some have provided the scientific novelty as being published for the first time publically. The downstream reactions which were directed from the P-35S promoter to the transgenic insert, have finished in obtaining the fragments of 856 bp for MON810 maize; 985 bp for LLRICE62 rice; 551 bp for T45 rapeseed; 493 bp for A2704-12 soybean; 428 bp for LLCOTTON25 cotton. The upstream reactions which were directed from the P-35S promoter to the plant flanking DNA (5'), have finished in obtaining the fragments of 847 bp for T45 rapeseed; 324 bp for A2704-12 soybean; 506 bp for LLCOTTON25 cotton (this genome walking reaction for MON810 and LLRICE62 was done in the previous segment of the study, see above). Two DNA sequences (partial CDS of LLRICE62 rice and T45 rapeseed transgenic inserts) were retrieved which are not reported yet in GenBank. The alignment study of these sequences showed the similarity to a binary vector sequence for the rice and the sequence of the rapeseed transgene has aligned with a transgenic maize sequence of the same constitution. Therefore, they do not show any alignment results when refining the similarity search to appropriate species from which DNA was extracted. The 985 bp fragment obtained from LLRICE62 rice with downstream genome walking covers most of the entire transgenic insert of this rice event, including part of the P-35S, the *bar* gene and the T-35S. The 551 bp fragment of T45 rapeseed, obtained from a downstream genome walking, encompasses the P-35S—*pat* gene junction of this event. The obtained fragment from T45 rapeseed however matched the other sequence when the alignment results were not refined to species level. This was a recombinant sequence in the GM maize having a similar transgenic insert as the rapeseed event we have selected (P-35S—*pat* gene junction aligned almost ideally).

The method of LT-RADE has been proven to be robust and user-friendly. RADE and LT-RADE require relatively high amounts of initial target copies to obtain large fragments, however the comparison of the genome walking techniques show that the fragments obtained by the LT-RADE are larger in size comparing to the other methods. However we could not present the estimation that the size of genome impacts the positive outcome when different sized genome plant DNA preparations are used in different starting concentrations. The LT-RADE efficiency is presumably not hampered by genome complexity but presumably more limited by accessible number of target

copies. The general positive outcome of the method's optimization and the sequencing results generated via the LT-RADE shows potential to adopt this method to any selective transgenic element. Two scientific publications in the international peer-reviewed journals cover the development and optimization as well as the application study of the LT-RADE.

RAPOLAS SPALINSKAS

Vilniaus universiteto Botanikos ir genetikos katedros doktorantas

Gimimo data ir vieta: 1983 m. liepos 5 d., Vilnius, Lietuva.

Išsilavinimas: 1990-2001 m. Vilniaus Žemynos gimnazija; 2001-2005 m. Vilniaus universitetas - biologijos bakalauras (molekulinės biologijos studijų programa); 2005-2007 m. Vilniaus universitetas - biologijos magistras (genetikos studijų programa).

Darbinė veikla:

2012-2014 m.: vaistų registracijos specialistas, UAB „Centralpharma Communications“, Vilnius, Lietuva.

2008-2011 m.: mokslo tyrėjas (asmeninis grantas), Europos Komisijos Generalinio Direktorato Jungtinio tyrimų centro Sveikatos ir vartotojų apsaugos instituto Molekulinės biologijos ir genomikos padalinyje, Ispra, Italija.

2007-2008 m.: mokslo stažuotojas, Europos Komisijos Generalinio Direktorato Jungtinio tyrimų centro Sveikatos ir vartotojų apsaugos instituto Molekulinės biologijos ir genomikos padalinyje, Ispra, Italija.

2003-2007 m.: mokslo stažuotojas ir vyr. laborantas, Botanikos instituto, ląstelių inžinerijos laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Asmeniniai grantai:

2008-2011 m. doktorantūros studijų moksliniai tyrimai buvo pilnai finansuojami iš Europos Komisijos skiriamo grantu (20 kategorija, doktorantams skiriami grantai; angl. *grantholder category 20 (Ph.D. student)*), tyrimams atlikti Jungtinio tyrimų centro Sveikatos ir vartotojų apsaugos instituto Molekulinės biologijos ir genomikos padalinyje.