

III. Génmanipulációs technikák

Génmanipuláció:

a gének *megváltoztatása*, vagy *átvitel*e egyik organizmusból a másikba → ezáltal az élő lények tulajdonságainak megváltoztatása.

A változás öröklődik, megjelenik a következő generációkban is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Indukált mutáció

A mutáció véletlenszerű folyamat, létrejöttének helyét nem tudjuk irányítani.

Ha egy bizonyos gén mutációja a célunk, akkor sok sejtet kell alávetni a mutációs kezelésnek. Ennek eredményeként sok és sokféle mutáns keletkezik, ezek közül kell kiválogatni azt a néhányat, amelynél éppen a megcélzott gén sérült.

Azaz nagyon sok mutáns törzset kell egyenként megvizsgálni, ami roppant munkaigényes. A táptalaj összetételének beállításával lehet szelektív növekedést elérni, de így is tenyészetek százait kell megvizsgálni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

III/1. Indukált mutáció

Ugyanaz, mint a spontán mutáció + természetes szelekció, csak itt szabályozott körülmények között hajtjuk végre indukált mutáció + célzott szelekció

Mutációkat lehet előidézni:

- besugárzással (UV lámpa, Röntgen besugárzás)
- vegyszerekkel (salétromosav, N-mustár, mitomicin)

Körülmények:

- kezelési idő (expozíció)
- sejtkoncentráció
- táptalaj összetétele



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

Hiánymutánsok = auxotróf mutánsok

Olyan mutánsok, amelyek a mutáció következtében elvesztették egy számukra létfontosságú anyag (amino-sav, nukleotid, vitamin) bioszintézisének képességét. Ezek csak akkor tudnak növekedni, ha ezt az anyagot készen kapják – ha belekeverjük a táptalajba.

Ezt a jelenséget kihasználhatjuk a hiánymutánsok azonosítására és elkülönítésére →

Vad törzs (prototróf): minimál-táptalajon (szénhidrát, ásványi sók) is képes növekedni.

Hiánymutáns (auxotróf): a minimál táptalajon nem növekszik, csak akkor ha azt kiegészítik az igényelt egy (vagy néhány) anyaggal.



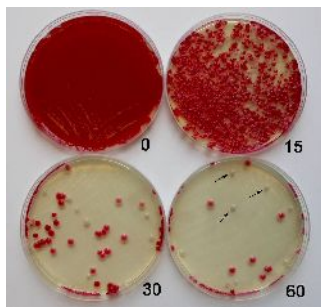
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Besugárzás mutagén hatása

A *Serratia marcescens* baktérium piros pigmentet termel. (Véres kenyér)

Az UV besugárzás során a sejtek egyre nagyobb hányada pusztul el. A túlélők között egyre több a mutáns egyed, amit a fehér telepek megjelenése mutat.



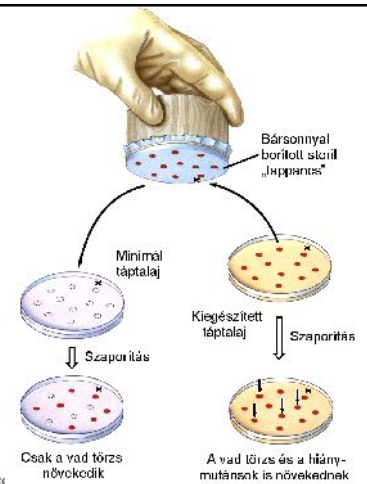
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Hiánymutánsok izolálása

A túlélő mutáns sejteket kiegészített táptalajon telepekké szaporítjuk.

Ezeket egy „tappanccsal” átvisszük a minimál táptalajra is. Amelyik a minimál táptalajon „elt” (nem tud növekedni) az a hiánymutáns.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Rezisztens (ellenálló) mutánsok

A vad törzst l abban térnek el, hogy valamely károsító, mérgező anyag jelenlétét sokkal nagyobb mértékben képesek elviselni.

Általában antibiotikum rezisztenciát értünk alatta, de lehet más anyag is.

A gátló anyagot tartalmazó tápoldaton csak a rezisztens telepek n nek ki, a vad törzs nem.



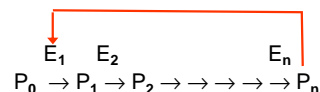
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

ALLOSZTÉRIKUS SZABÁLYOZÁS

Egyes enzim molekuláknak két, vagy több különböző aktivitású alakja lehetséges. Ezek reverzibilisen átalakulhatnak egymásba. Az „átkapcsolást” egy (vagy több) modulátor molekula kötődése hozza létre (harmadlagos, negyedleges szerkezet megváltoztatása).

Végtermék-gátlás (feed back inhibíció): egy reakciólánc végterméke visszahat és lefékezi saját termelését, a legelső enzim működését:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

Antimetabolitok

... olyan vegyületek, amelyek szerkezetükben hasonlítanak egy „valódi” metabolitra. A sejtben a hasonlóság révén egyes enzimeket „be tudnak csapni”, másokat nem. A vad típusú sejtekre mérgező hatással vannak, csak egyes rezisztens mutánsok képesek túlélni az antimetabolitos kezelést.

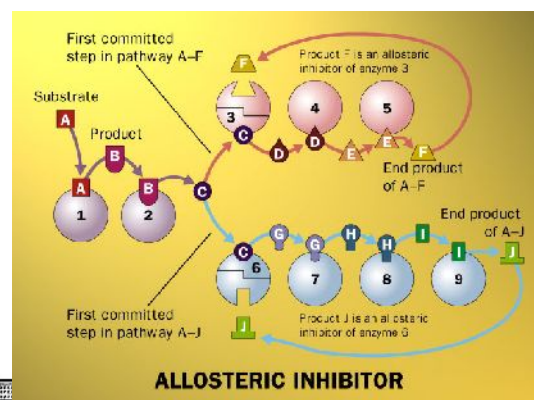
Ennek jobb megértéséhez idézzük vissza az allosztérikus szabályozás működését.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

Elágazó reakcióláncok szabályozása

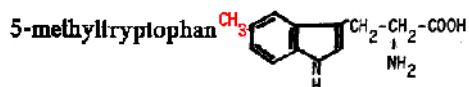
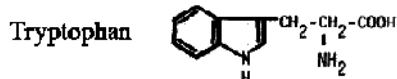


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

A triptofán és antimetabolitja

Triptofán – fehérjealkotó aminosav
5-metil-triptofán - antimetabolit



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Antimetabolit rezisztencia

Az antimetabolitok szerkezeti hasonlóságuknál fogva szintén kapcsolódhatnak az enzimekhez, és le tudják fékezni a bioszintézist.

„Be tudják csapni”, ezeket a szabályozó mechanizmusokat, „elhitetik” a sejtet, hogy a kérdéses metabolit b ségesen rendelkezésre áll, termelését emiatt le kell állítani, pedig valójában hiányzik.

A vad törzs anyagcseréje leáll, a sejt elpusztul. Csak azok a rezisztens mutánsok élnek túl az antimetabolitos kezelést, amelyeknél ez a szabályozó mechanizmus sérült, és a túltermelést nem fékezi semmi.




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

Ipari termelés túltermel mutánsokkal

A biotechnológiai iparnak egy fontos ágazatában a sejtekben egy amúgy kis koncentrációban jelen lévő anyagot a természetesnél sokkal nagyobb mennyiségben termeltetnek. Ehhez a sejtek genetikai állapotát mutációkkal több ponton is át kell alakítani – így jutnak túltermel mutánsokhoz.

Ezt a technikát nevezik ANYAGCSERE MÉRNÖKSÉG-nek (metabolic engineering) →



13

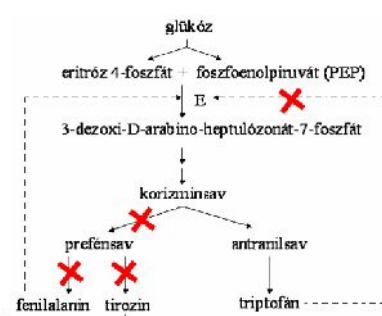

A TRIPTOFÁN EL ÁLLÍTÁSA

Bioszintézis: szénhidrátokból sok lépéssel. A japánok oldották meg *Corynebacterium* és *Brevibacterium* törzsekkel

Anyagcsere-mérnöki szelektió:

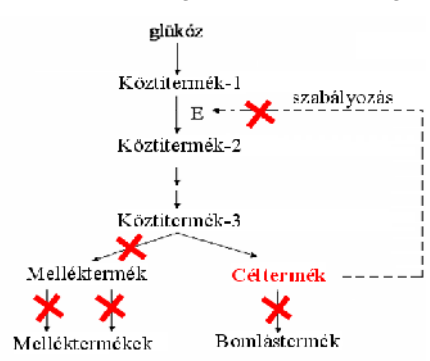

Auxotrófiák: Phe⁻, Tyr⁻,

Rezisztencia: 5-Me-Trp^r

BME Alkal

Anyagcsere mérnökség – metabolic engineering

14

Indukált mutáció antibiotikum termel törzseknél

Az antibiotikumok bioszintézise sokkal bonyolultabb, az anyagcsere mérnökség nem volt alkalmazható. Ekkor a törzset „black box”-nak (fekete doboznak) tekintjük, csak a célra, a minél nagyobb antibiotikum termelésre koncentrálnunk.

A mutáns törzsek közül a legjobb termelő képességeket választjuk ki, és ezeket újabb és újabb mutációknak vetjük alá, és minden lépésben a legjobbakat használjuk ipari termelésre.




17

Anyagcsere mérnökség – metabolic engineering

A primer metabolitok el állításánál a génállományt úgy változtatják meg, hogy:

1. A bioszintézis út elágazásait lezárják, ezáltal minden anyag a céltermék irányába áramlik (auxotróf mutánsok). Ha ez létfontosságú molekulák el állítását érinti, akkor leaky (szivárgó) mutánsok, vagy tápoldatkiegészítés.
2. A terméket továbbalakító reakciólépéseket eliminálják.
3. Felfüggesztik a túltermelést megakadályozó mechanizmusokat (antimetabolit rezisztens mutánsok)



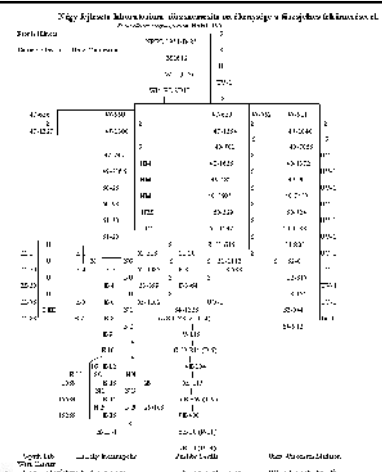

15

Penicillin termelés fokozása mutációival

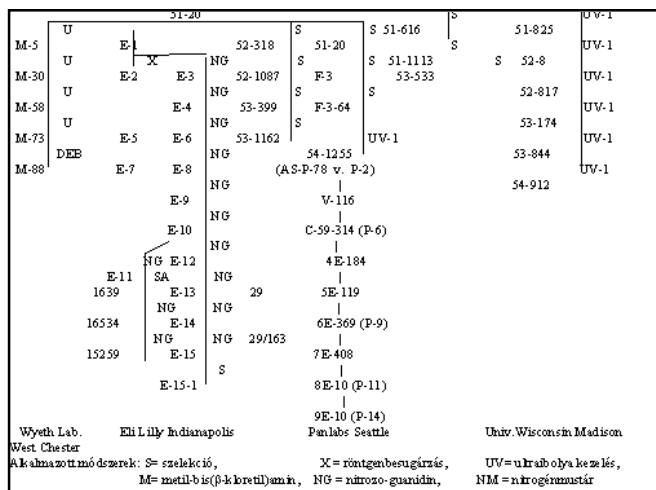
A penicillin termelő törzs mutációs fejlesztése (50-es évek →)

Hatóanyagtartalom a fermentáció végén:

1929 ~ 0,01 g/liter
 1943 ~ 0,30 g/liter
 2000 ~ 80 g/liter

BME Alkal



Indukált mutáció - értékelés

Nem célzott, irányított változtatás. A sokféle mutánsból szelekcióval kell kiválasztani a nekünk kedvező változókat hordozókat.

~70 éve működik, klasszikus technika.

Veszélyessége kicsi, mert:

- inkább elvesz, mint hozzáad a tulajdonságokhoz
- emiatt a mutánsok kevésbé életképesek, mint a vad törzsek – a természetbe kikerülve nem versenyképesek
- zárt térben (üvegedények, fermentorok) szaporítják, a környezetbe csak véletlenül kerülhetnek.

