

III. Génmanipulációs technikák

Génmanipuláció:

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

A változás öröklődik, megjelenik a következő generációkban is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

1

III/1. Indukált mutáció

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

Mutációkat lehet elidézni:

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

Körülmények:

- kezelési idő (expozíció)
- sejtkoncentráció
- tápoldat összetétele



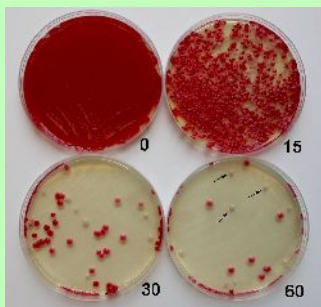
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

2

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 Élelmiszertudományi Tanszék

3

Indukált mutáció

A mutáció véletlenszer 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 munkáigényes. A táptalaj összetételének beállításával lehet szelektív növekedést elérni, de így is tenyészetek százait kell megvizsgálni.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

4

Hiánymutánsok = auxotróf mutánsok

Olyan mutánsok, amelyek a mutáció következtében elvesztették egy számukra létfontosságú anyag (aminosav, 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.



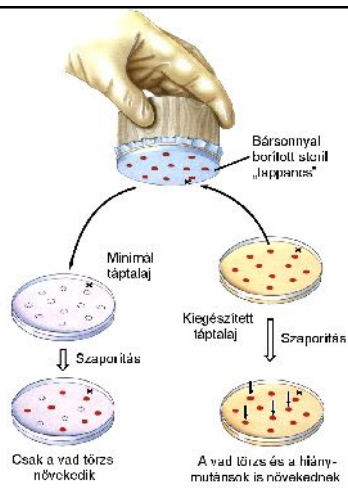
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

Hiánymutánsok izolálása

A túlél mutáns sejteket kiegészített táptalajon telepekké szaporítjuk.

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



BME Alkalmazott

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 Élelmiszertudományi Tanszék

7

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 m kódését.



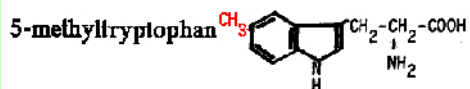
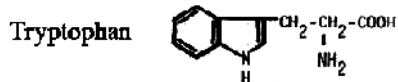
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

8

A triptofán és antimetabolitja

Triptofán – fehérjealkotó aminosav

5-metil-triptofán - antimetabolit



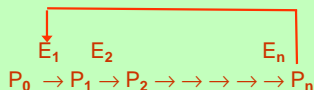
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

9

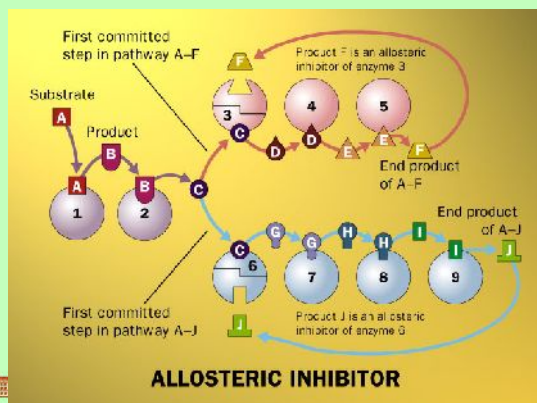
ALLOSZTÉRIKUS SZABÁLYOZÁS

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

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



Elágazó reakcióláncok szabályozása



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, amelyknél ez a szabályozó mechanizmus sérült, és a túltermelést nem fékezi semmi.



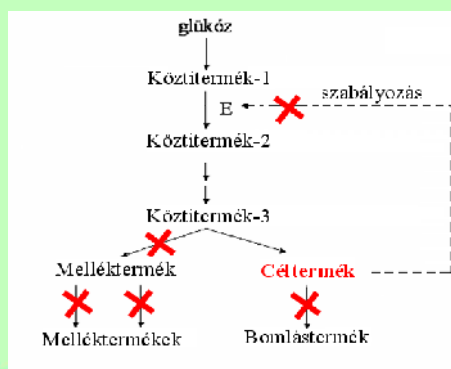
Ipari termelés túltermel mutánsokkal

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 állományát mutációkkal több ponton is át kell alakítani – így jutnak túltermel mutánsokhoz.

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



Anyagcsere mérnökség – metabolic engineering



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 mutások). Ha ez létfontosságú molekulák el állítását érinti, akkor leaky (szivárgó) mutások, vagy tápoldatkiegészítés.
2. A terméket továbbalakító reakciólépéseket eliminálják.
3. Felfüggesztik a túltermelést megakadályozó mechanizmusokat (antimetabolit rezisztens mutánsok)



A TRIPTOFÁN EL ÁLLÍTÁSA

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

Anyagcsere-mérnöki szelekció:

Auxotrófiák:
Phe⁻, Tyr⁻,

Rezisztencia:
5-Me-Trp^r

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

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 képességet választjuk ki, és ezeket újabb és újabb mutációknak vetjük alá, és minden lépcsőben a legjobbakat használjuk ipari termelésre.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

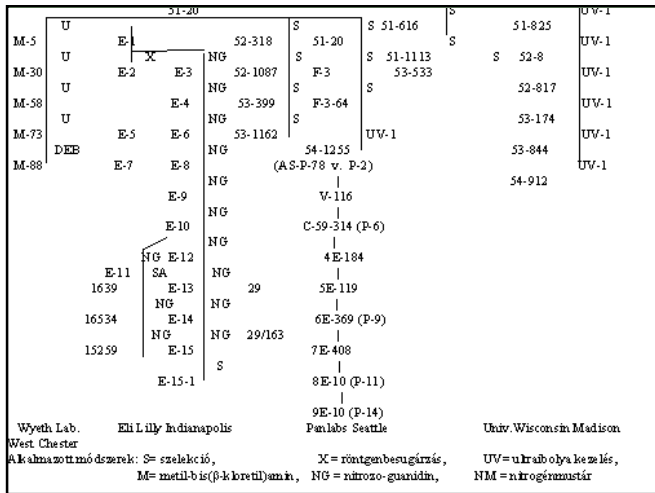
Penicillin termelés fokozása mutációval

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 Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék



Indukált mutáció - értékelés

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

~70 éve m velik, klasszikus technika.

Veszélyessége kicsi, mert:

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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

20
