

Génmanipulációs technikák – 2018. 03. 05.

A DNS *közvetlen* megváltoztatását jelentik (új gén bevitele, meglévő gének módosítása vagy törlése).

Lehetnek véletlenszerűek vagy célzottak.

Véletlenszerű: pl. indukált mutáció, protoplaszt fúzió.

Célzott: pl. plazmid bevite a sejtbe.

Nem számít génmanipulációnak a DNS szaporítás útján történő, *közvetett* megváltoztatása.

„Szamár” öszvér

„Ló” öszvér

*Az öszvér a közvetett
DNS módosítás példája.*



III/2. Protoplaszt fúzió

Protoplaszt: Sejtfalától megfosztott, kívülről csak **sejtmembránnal** borított sejt.

Mesterségesen hozzuk létre a sejtfal eltávolításával. Elveszti az alakját, gömbölyű citoplazma cseppé válik.

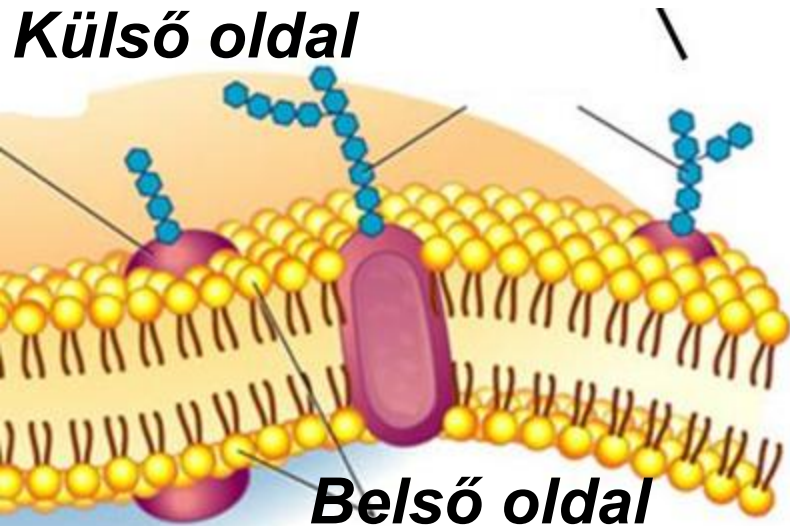
Nagyon sérülékeny, érzékeny a:

- mechanikai hatásokra (keverés, rázás, pipettázás)
- **ozmózis nyomásra** (csak tömény cukoroldatokban tartható)

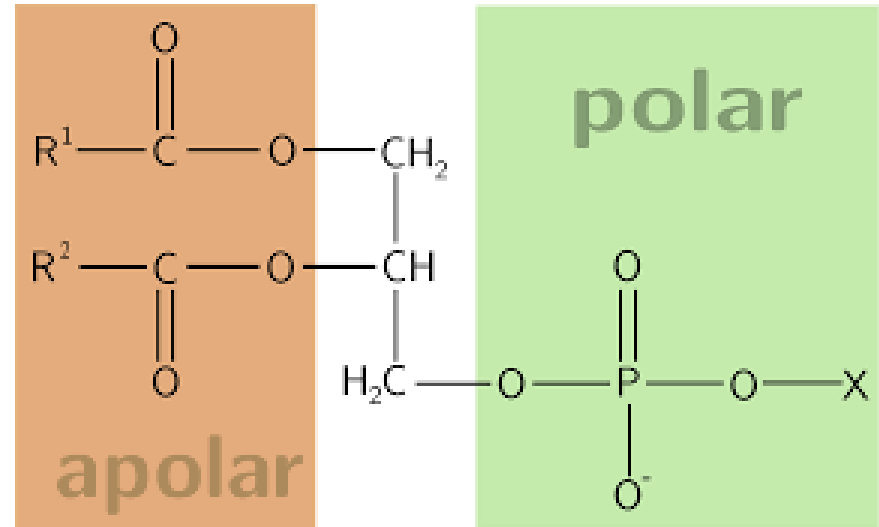


Sejtmembrán (sejthártya)

Külső oldal

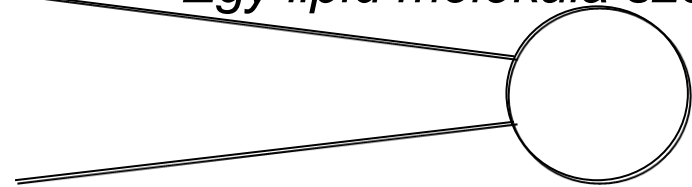


Belső oldal



<http://slideplayer.com/slide/9365958/28/images/2/Anatomy+of+a+Cell+Membrane.jpg>

Egy lipid molekula szerkezete



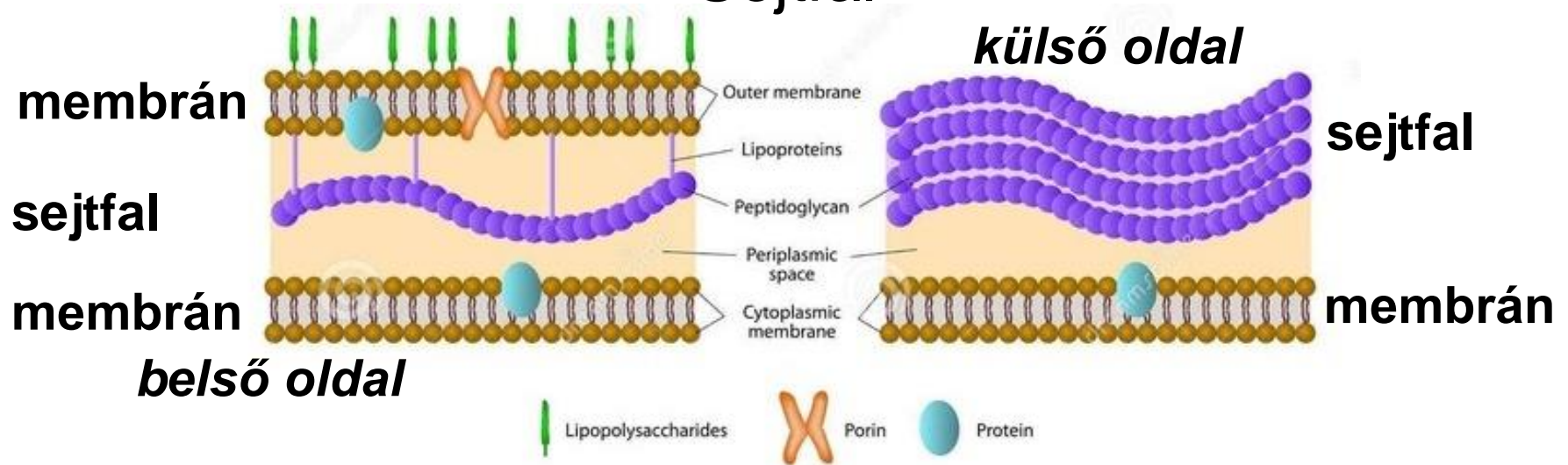
Hosszú apoláris szénlánc

Rövid poláris csoport

- zsírszerű anyagok = lipidek (sárga)
- Membránfehérjék (lila)
- felszíni cukor egységek (kék)
- **Apoláris** lánc és **poláris** „fej”
- Membrán nélkül a sejt elpusztul
- mert „egyensúlyba kerül” a környezetével.
- A membrán tehát egy határoló felület.
- A sejtfal a sejtmembránon *kívül* elhelyezkedő többlet határoló₃felület.



Sejtfal



Gram-negatív (balra) és gram-pozitív (jobbra) baktériumok sejtfala

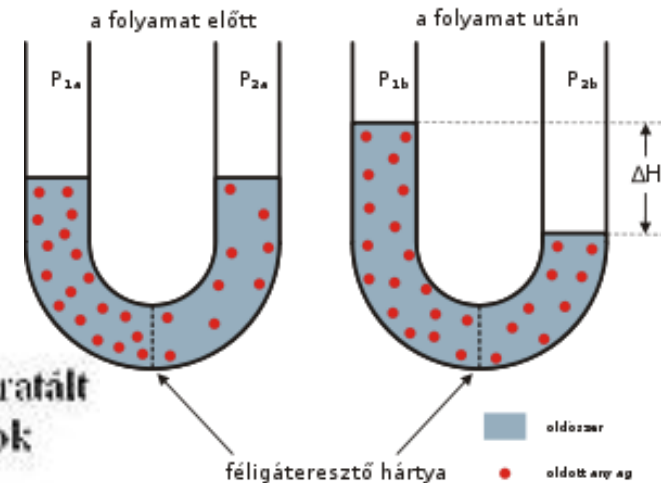
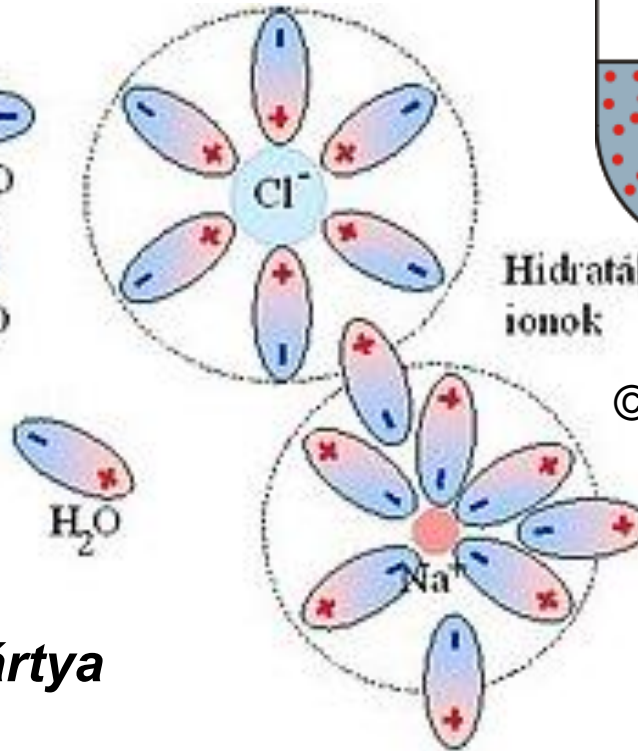
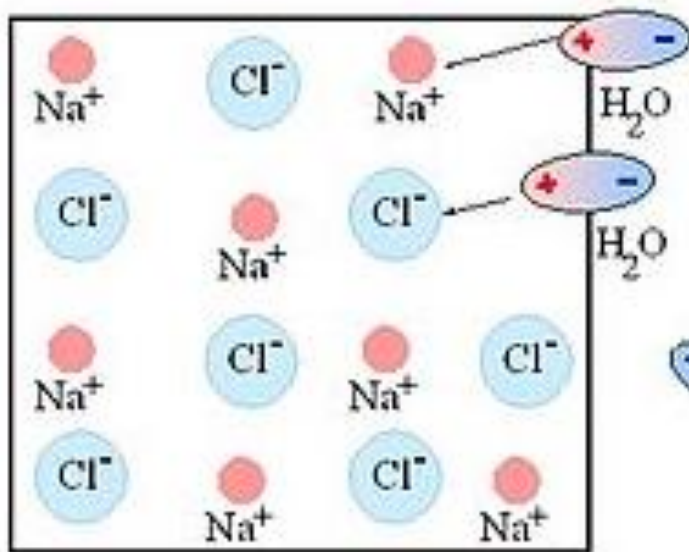
<https://www.dreamstime.com/stock-illustration-gram-positive-gram-negative-bacteria-difference-bacterial-image45337024>

ID 45337024 © [Designua](https://www.dreamstime.com/stock-illustration-gram-positive-gram-negative-bacteria-difference-bacterial-image45337024) | Dreamstime.com

- A sejtfal a sejtmembránon *kívül* elhelyezkedő többlet határoló felület.
- Felépülhet pl. szén-hidrát polimerekből vagy cukor-aminosav óriásmolekulákból.
- Növényeknek, gombáknak, a legtöbb baktériumnak, algáknak van...
- De az állatoknak és állati egysejtűeknek (protista-k) nincsen sejtfaluk.
- Szilárdít, mechanikai védelmet ad, durva szűrőként működik,
- Véd az **ozmotikus stressz** ellen. → sejt+sejtfal ~ „nyomástartó edény”



Az ozmózis



© Hans Hillewaert, osmosis, wikipedia.org

$$P_{\text{ozmózis}} = \rho \cdot g \cdot \Delta H$$

Négyzet: féligáteresztő hártya (pl. sejthártya)

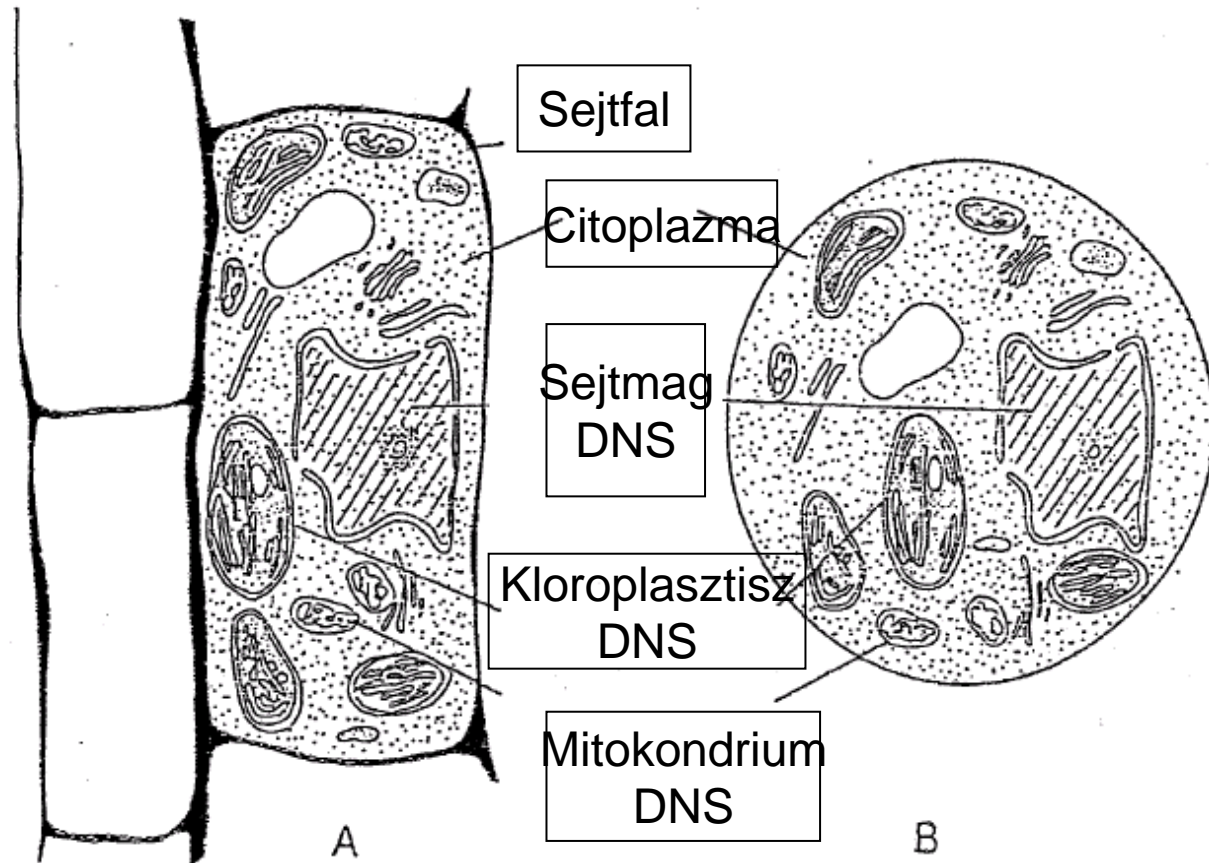
© Dr. Báder Imre, ozmózis, wikipedia.hu

- Az oldószer (itt a víz) átjut a sejthártyán
- De a nagyobb molekulák (pl. fehérjék, RNS) nem tudnak kilépni
- Hajtóerő a belső és külső kémiai potenciál (~ a koncentrációkülönbség) kiegyenlítésére.
- Ozmózis nyomás fogalma



Protoplasztok

Mindenféle sejtől (baktérium, élesztő, növény) lehet protoplasztot csinálni, de a tipikus alkalmazása a **növények genetikai manipulációja**.



1. ábra. A növényi sejt (A) és az abból izolált protoplaszt (B) vázlatos ábrázolása, különös tekintettel az örökítő- (genetikai) anyag lokalizálására



Protoplaszt izolálás, előállítás

Sejtfal lebontása:

1. *A megfelelő sejt kiválasztása*

Elvileg bármely sejtől előállítható, de a legegyszerűbb laboratóriumban nevelt növényi szövetenyészetből.

2. *Steril körülmények biztosítása:*

Steril edények, táptalaj (a mikrobák ellen antibiotikum)

Manipuláció steril levegőjű térben

3. *A sejtfal leemésztése megfelelő enzimekkel.*



Protoplaszt izolálás, előállítás

4. Kíméletes körülmények:

a protoplasztok mechanikailag sérülékenyek, a pipetázás, centrifugálás, keverés, rázás során vigyázni

5. Ozmotikus védelem:

Plazmolitikumok - nem metabolizálható szénhidrátok (mannit, xilit, szorbit) használata (10-13%).

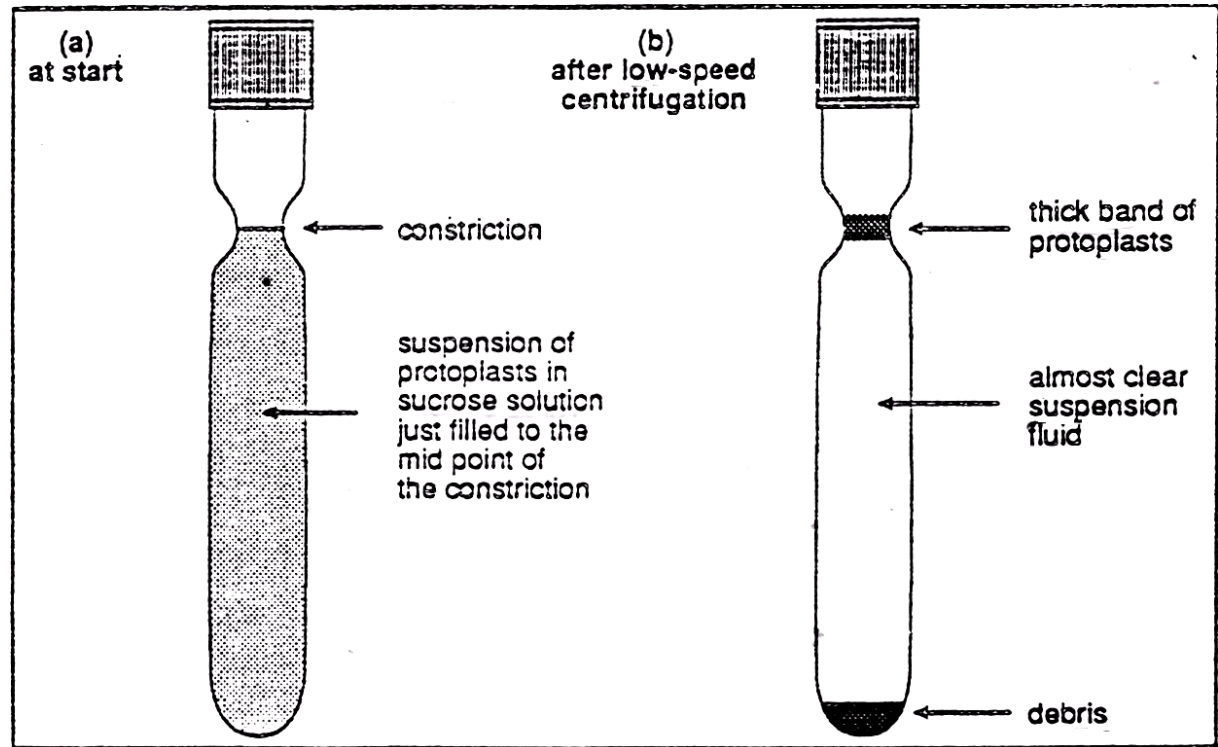
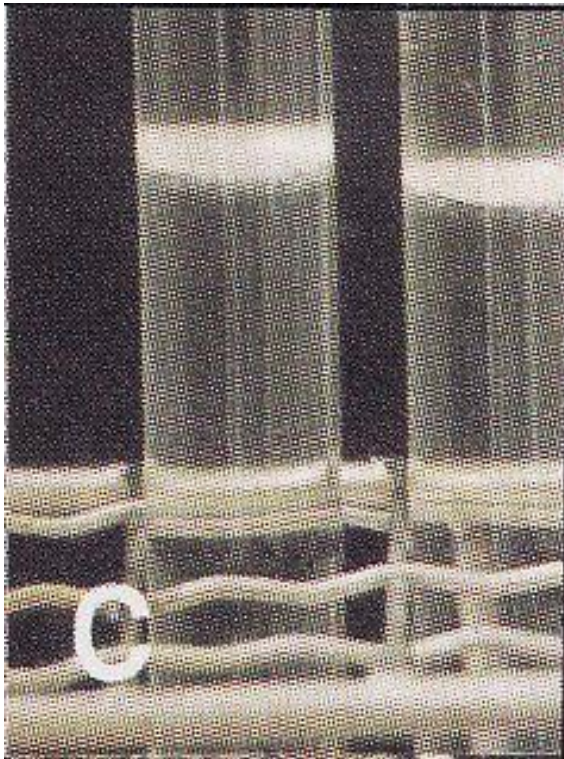
A glükóz vagy szacharóz erre nem jó, mert a sejtek elfogyasztják, ettől csökken a közeg ozmózisnyomása – elpusztulhat a sejt. Ezért csak a tápláláshoz adnak egy keveset.



Protoplaszt előállítás

Centrifugálás: BABCOCK-CSÖBEN, „felfugálás”

A protoplasztok sűrűsége kisebb, mint a cukor oldaté, ezért feljönnek felszínre. A növényi maradék pedig leülepszik.



Protoplasztok tenyésztése

A protoplasztot a sejtfal hiánya nem akadályozza a növekedésben és az osztódásban.

Szénhidrátok:

- bontható cukrok – tápanyag (glükóz, szacharóz, maltóz v. ezek keveréke) 1-2%
- nem bontható cukoralkoholok – 10-13%

Tápanyag: ásványi sók

Növényi hormonok

Módszer: mikroszkóp alatt, tárgylemezen, néhány cseppnyi folyadékban



Protoplaszt fúzió

Protoplaszt fúzió: két protoplaszt beltartalamának egyesítése, fúziója. Eukarióták esetében a hibridnek két különböző sejtmagja lesz (heterokarion), és tartalmazza mindkét fél kloroplasztjait és mitokondriumait is (amelyek szintén tartalmaznak DNS-t).

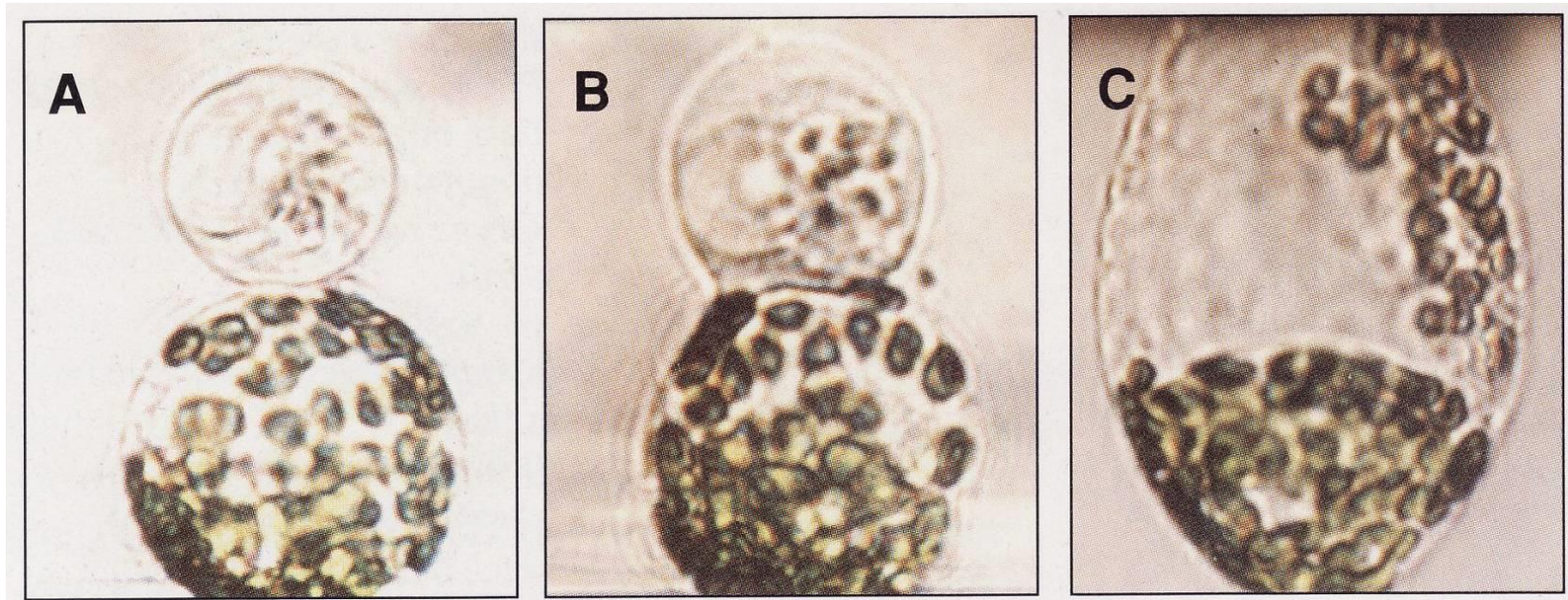
A fúzió után a hibrid sejt a következő osztódások során a fölös számú kromoszómák nagy részét elveszti, és valamelyik szülő félhez válik hasonlóvá, csak néhány új gén/tulajdonság stabilizálódik. Ez a génmanipulációs módszer sem célzott, irányított, a létrejövő utódok tulajdonságai véletlenszerűen alakulnak ki. → szelekció



Protoplaszt fúziós módszerek

Mikroszkóp alatt, speciális tárgylemezen, folyadékban
(elektromos és/vagy vegyszeres technikák)

Burgonya PP elektrofúziója:



Növények regenerálása protoplasztból

Az növényi sejtek különleges tulajdonsága a totipotencia = egyetlen sejtől regenerálható a teljes növény, ami azután kiültethető, szaporítható. →

Egy megváltoztatott tulajdonságú sejtől teljes, életképes növényt fejleszthetünk, amelynek minden sejtje hordozza az új géneket. Az ivarsejtek is, azaz a változás öröklődik.

A megfelelő növényi hormonok megfelelő időben történő adagolásának segítségével tudjuk a totipotens sejteket a szöveti differenciálódás (szövétté fejlődés) irányába terelni.



Protoplaszt tenyésztés, regenerálás

A regenerálás első lépése a sejtfal újraképzése. A falszintézis a protoplaszt létrejöttének pillanatától megindul. Ezt a természetes folyamatot meg lehet gyorsítani, egyrészt hormonálisan, másrészt a közeg ozmózisnyomásának fokozatos csökkentésével.

Pl.: a kiindulásnál 9 %-nyi mannitot a hetenkénti átoltsátnál 6, majd 3 %-ra csökkentik.

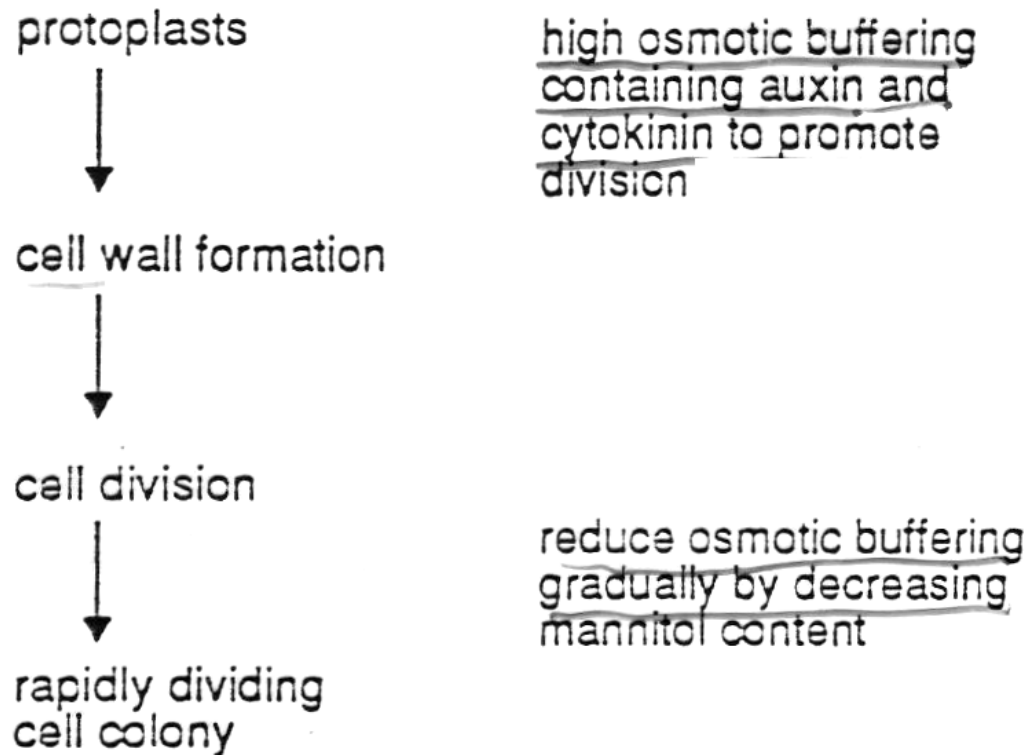
A regenerálódó sejtek előbb sejtcsomókat képeznek (szuszpenziós tenyészet), majd **kalluszt** (nem differenciálódott növényi sejtek együttese) képeznek.

Ebből aztán teljes növényt lehet regenerálni.

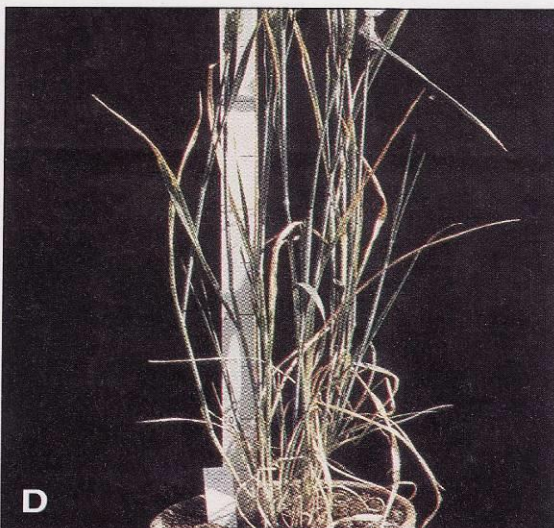
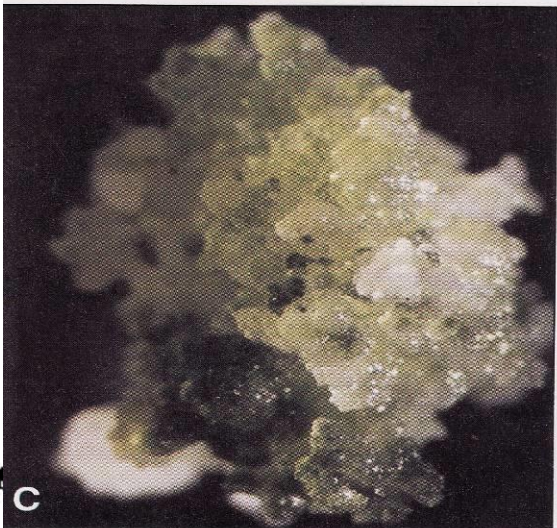
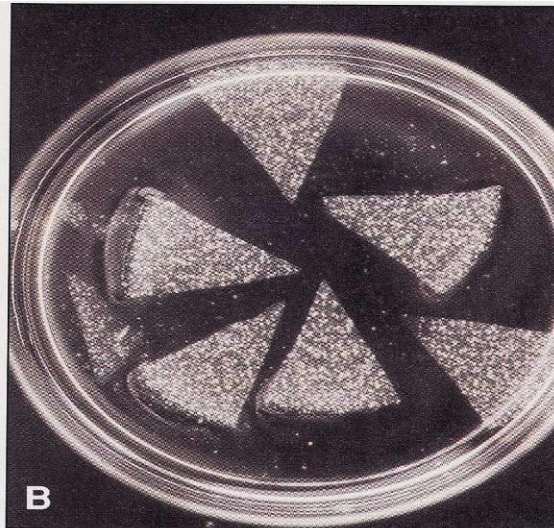
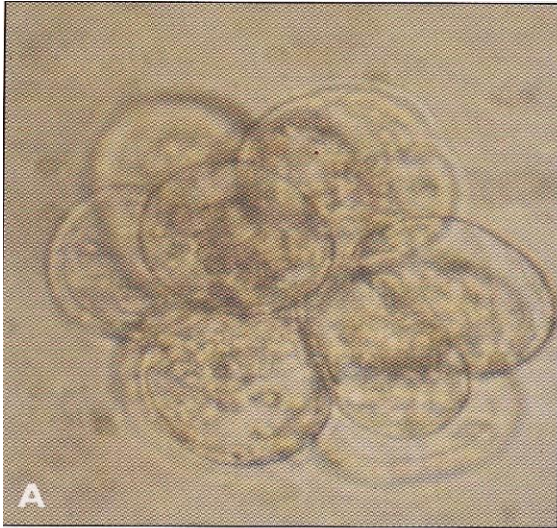


Protoplasztból növényregenerálás

Az első protoplasztból regenerált növény a dohány volt (Takabe 1971). Lépések:



Termékeny búzanövények felnevelése protoplasztokból



A: PP eredetű többsejtes kolónia

B: Mikrokolóniák kialakulása agarózba ágyazott sejtekből

C: kallusz tenyészet

D: PP eredetű termékeny búzanövény

Keresztezés és protoplaszt fúzió összehasonlítása

Keresztezés: két különböző tulajdonságú egyed gén-állományának egyesítése ivaros szaporítással. Régi nemesítési módszer – kulcsszerepe (volt) az új fajták előállításában

Fajon belüli fajták keresztezése: néhány tulajdonság változik

De: nem lehet mindent keresztezni mindennel. Csak rokon fajták, fajok között működik.

A rendszertani távolság növeli az inkompatibilitást.

A megtermékenyítés szabályozása (anatómiai és egyéb) rendszerint kizárja az idegen pollennel való beporzást, csak a fajon belül termékenyül.



Keresztezés és protoplaszt fúzió

→ ezért előnyös keresztezés helyett protoplasztokat egyesíteni, ez megkerüli az ivaros szaporodás akadályait.

A fúzió nagyon különböző fajok között is lehetséges!

„Mindent mindennel lehet fuzionáltatni” – a protoplasztok szintjén – de azután jönnek a problémák.

A fuzionált sejtek osztódnak, de a növény-regeneráció csak ritkán valósítható meg.

Sejtvonalként fenntarthatók, de nem regenerálhatók:

sárgarépa-árpa, szója-repce, kukorica-borsó,

szója-Drosophila: mindkét sejtmag osztódik

petúnia-egér: osztódás, sejtfal és hemoglobin szintézis



Protoplaszt fúzió, aszimmetrikus hibridek

Ha sikerül is növényt nevelni, akkor legtöbbször rendellenes morfológiájú és steril alakok jönnek létre.

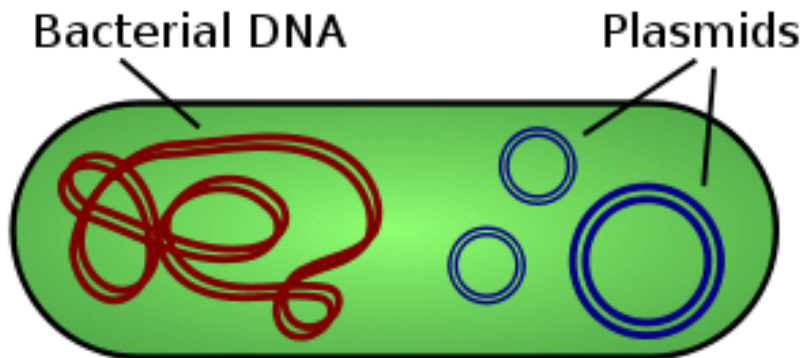
Hosszú (több éves) sejttenyésztés során valamelyik partner génjei fokozatosan eltűnnek, és csak néhány kromoszóma marad = aszimmetrikus hibrid

Ezekből lehet élet- és szaporodóképes növényt regenerálni, ami a domináns eredeti partnerhez képest csak egy-két új tulajdonságot hordoz.



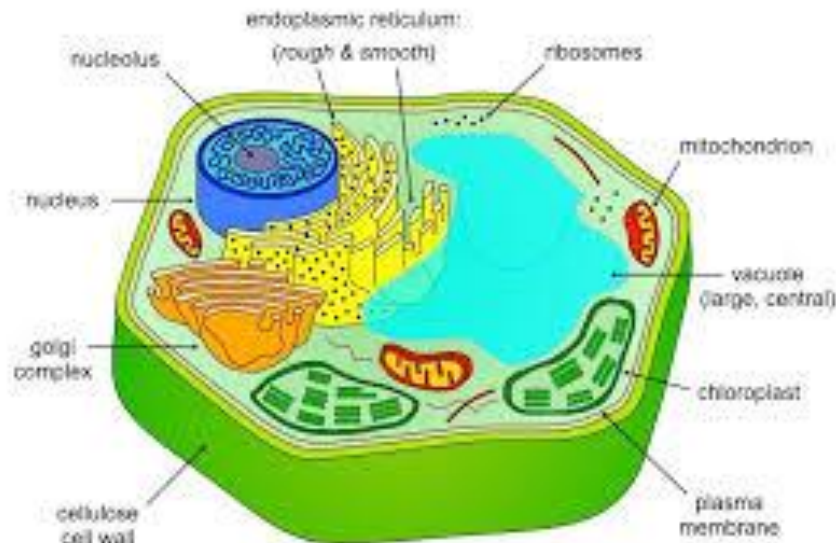
Hol találhatóunk DNS-t egy sejtben?

* endoszimbióta elmélet



Prokarióták:

- **Genomi DNS**
- **Lehetnek jelen plazmidok**



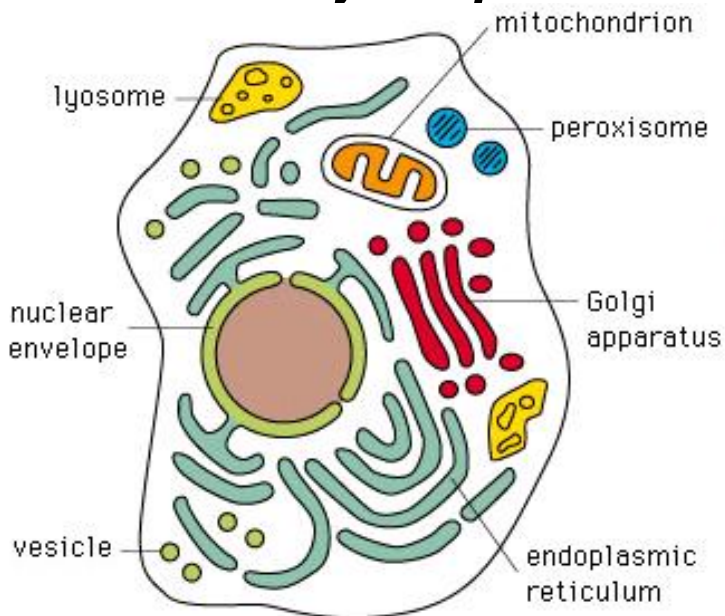
Forrás: <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/12-ultrastructure-of-cells/eukaryotic-cells.html>

Növényi eukarióták:

- **Genomi DNS a sejtmagban**
- **Mitokondriális DNS***
- **Színtest DNS***
- **Esetenként plazmidok**

Nem növényi eukarióták:

- **Genomi DNS a sejtmagban**
- **Mitokondriális DNS***
- **Gombákban létezhetnek plazmidok**



Cibridizáció

= citoplazmatikus hibridizáció

Nem a sejtmagban lévő kromoszómák átvitelére irányul, hanem a sejtiszervekben (kloroplaszt, mitokondrium) lévő DNS bevitelére.

A hibrid sejtben az egyik félből származik a sejtmag, a másiktól kloroplasztok → új kombinációk → új tulajdonságok



Protoplaszt fúzió - eredmények

Vírus-rezisztens burgonya fajták előállítására:

Solanum tuberosum (étkezési burgonya) és
Solanum brevidens (perui, vírusálló fajta) fúziója →

A vírus-rezisztencia átment a kultúrfajba.



Protoplaszt fúzió - értékelés

Ez sem célzott, irányított változtatás. Nem lehet előre tudni, hogy milyen tulajdonságok stabilizálódnak végül. Lassú módszer, hónapokig, évekig tart. A kiszámíthatatlansága miatt hátrányos tulajdonságok is átkerülhetnek.

~40 éve művelik, klasszikus technika.

Veszélyessége kicsi, mert:

- A hibridek általában kevésbé életképesek, mint a vad törzsek – a természetbe kikerülve nem versenyképesek
- A természetben jelen lévő gének a saját környezetükkel együtt kerülnek át más sejtbe.

