

III/3. Gének átvitel vektorokkal

Vektor: (molekuláris) biológiai rendszer, amely képes új/idegen genetikai információt bejuttatni egy sejtbe. Független szaporodásra képes.

Fajtái:

- Plazmidok (1-10 kb)
- Bakteriofágok (10 – 23 kb)
- Más vírusok
- Mesterséges kromoszómák (~300 kb)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

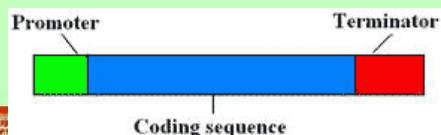
Vektorok

Más csoportosítás szerint:

Klónozó vektorok: csak a gén(ek) bevitelére alkalmas, a kiíráshoz nem tartalmaz semmit.

Expressziós vektorok: a bevinni kívánt gén(ek) mellett a szabályozott kiíráshoz szükséges szakaszokat is tartalmazza →

Expressziós kazetta/keret: a célgén előtt: promóter szakasz, utána: terminátor szakasz.



2

Plazmid vektorok

A plazmid vektorok jellemző részei:

- **Replikációs origó** – a plazmid DNS duplikációjának kezdő pontja, enélkül nem tud sokszorozódni a plazmid
- **Promóter szakasz** - itt indul a kiírás mRNS-re (ld. operon)
- **Célgén(ek)** – ezek által kódolt fehérjét akarjuk előállítani a sejtben
- **Terminátor szakasz** – ez zárja le a kiírandó gének sorát.
- **Marker gén(ek)** – a sikeresen bevitt és működő géneket tartalmazó sejtek szelekcióját segítik, pl. antibiotikum rezisztencia → antibiotikumot tartalmazó tápoldaton csak a plazmidos sejtek növekednek, a többi elpusztul.



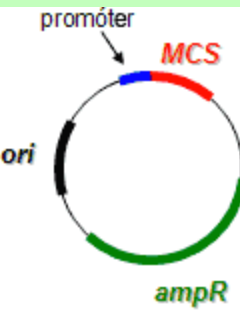
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

3

Plazmid vektorok

A plazmid vektorok jellemző részei:

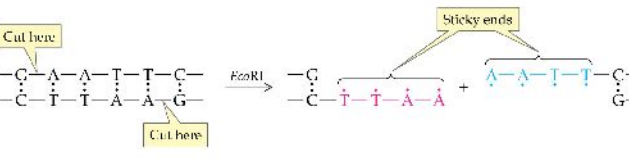
- ori = replikációs origó
- ampR = ampicillin rezisztencia gén
- MCS = multiple cutting site = (több-féleképpen) felvágható szakasz = itt lehet felnyitni a gyűrűt, és beilleszteni amit akarunk.



4

„Ragadós” végek

- Az átvenni kívánt gén izolálása: a hordozó sejt DNS-ének feldarabolása, a keresett gén izolálása
- Beépítés a plazmid DNS-be. „Szabás-varrás” Kell hozzá olló és ragasztó.
„Olló:” enzimek, restrikciós endonukleázok. A kettős



5

Restrikciós enzimek

Mikroorganizmus	Enzim	szekvencia 5' → 3'	Bontási helyek száma			
			A	2	SV40	x17
<i>Arthobacter luteus</i>	AluI	AG↓CT	>50	>50	35	24
<i>Brevibact. albidum</i>	Ball	TGG↓CAA	15	17	0	0
<i>H. aegypticus</i>	HaeIII	GG↓C' C	>50	>50	19	11
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaI	GTT↓AAC	13	6	4	3
<i>Serr. marcescens Sb</i>	SmaI	CCC↓GGG	3	12	0	0
<i>B. amyloliquefaciens H</i>	BamHI	G↓GATC' C	5	3	1	0
<i>E. coli RY13</i>	EcoRI	G↓AA↓TTC	5	5	1	0
<i>H. influenzae Rd</i>	HindIII	A↓AGCTT	6	11	6	0
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaII	C↓C'GG	>50	>50	1	5
<i>K. pneumoniae OK8</i>	KpnI	GGT↓AC' C	2	8	1	0
<i>X. holcicola</i>	XhoI	C↓TCGAG	1	6	0	1

6

Átvitel plazmidokkal

„Ragasztó”: a ragadós végek maguktól is összetapadnak, de a cukor-foszfát lánc összekapcsolásához kell egy enzim (T4 DNS-ligáz).

(a) (b) (c)

7

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Átvitel plazmidokkal

3. Bevitel a gazdasejtbe:
 - kémiai,
 - elektromos hatásokkal
4. Manifesztáció + szelekció: a kívánt gén mellé egy marker (nyomjelz) gént is beépítenek (pl. antibiotikum-rezisztencia), ami segít kiválasztani azokat a sejteket, ahol megtörtént a beépülés, és „m kódik” a plazmid. Az adott antibiotikumot tartalmazó táptalajon csak a rezisztenciagént (azaz a plazmidot) sejtek indulnak növekedésnek.

8

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Teljes séma:

Ezzel az eljárással a prokariótákba és eukariótákba is szinte bármilyen gént be lehet vinni.

Cél: fehérjetermelés

- hormonok
- vakcinák
- enzimek
- immunfehérjék
- vérfehérjék

Cloning into a plasmid

9

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Alkalmazás: idegen fehérjék el állítása

A humán inzulin (proinzulin) el állítása *E. coliban*.
Genentech, 1978. Humulin

Pancreas → Mammalian proinsulin mRNA → Proinsulin cDNA → Recombinant plasmid → Transformed bacterium

EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 10

Ingázó (shuttle) vektorok

Az eukarióták plazmidjai és vírusai másképpen szaporodnak mint a prokariótáké, másfajta replikációs origójuk van. Az eukarióta sejtek génmanipulációjához tehát más vektorokra van szükség. Sokszor viszont baktériumokból kell átvenni géneket eukariótákba – és vissza. Ehhez olyan vektorokra van szükség, amelyek mindkét sejtípusban szaporodni tudnak. Ezekben kétféle replikációs origó található, egy a prokarióta és egy az eukarióta sejtekhez.

Emellett a rezisztencia markerek is különbözők, másfajta antibiotikumok hatékonyak a prokarióták és eukarióták ellen → kétféle rezisztencia gént kell beépíteni.

EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 11

Ingázó (shuttle) vektorok

EME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 12

Génátvitel *Agrobacterium* plazmidokkal

Az *Agrobacterium*ok 4 faja ismert:

1. *Agrobacterium tumefaciens*: gyökérgolyva, koronagubacs. A sérülések helyén alakul ki fert zés.

A Ti plazmid nem differenciált szövetburjánzást idéz el . A sejtek olyan anyagokat termelnek amelyeket a baktérium felhasznál.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

2. *Agrobacterium rhizogenes*: RI (root inducing) plazmidja vattaszer hajszálgökér burjánzást okoz.

3. *Agrobacterium rubi*: gyümölcsfánál, málnánál gyökérgolyva, vessz golyva

4. *Agrobacterium radiobacter*: plazmidja nem okoz betegséget, de antibiotikumot (agrocint) termel gént hordoz. Ugyanezen a plazmidon található az agrocin elleni rezisztenciát biztosító gén is – megvédi saját magát.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Az *A. tumefaciens* fert zés

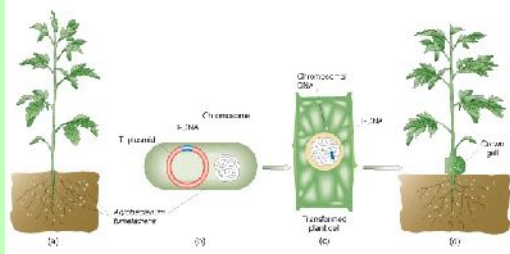
Az *Agrobacterium tumefaciens* egy Gram-negatív növénypatogén talajbaktérium, amely a kétszik növényeket a sebzési helyeken megfert zi és tumorokat okoz rajtuk. A baktériumok patogenitása összefügg a tumorindukáló (Ti) plazmid jelenlétével. A Ti plazmid egy része (transzfer DNS = T-DNS) a kórfolyamat során átkerül a növényi sejtbe és a sejt DNS-állományába integrálódik (A T-DNS régióban helyezkednek el a tumorok kialakulásáért felel s gének.)



BME Alkalmazott

Az *A. tumefaciens* fertőzés

Kétszik eknél: Az *Agrobacterium tumefaciens* növény-patogén törzs Ti (tumor indukáló) plazmidja a T-DNS szakaszt beépíti a megfertőzött növény kromoszómájába.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

16

A Ti plazmid

$1,2 \times 10^8$ molekulatömegű, gyűrű alakú DNS molekula. A baktériumban önállóan replikálódó genetikai egység.

A plazmid DNS-nek van egy transzformáló (T-) DNS szakasza. Ennek nagysága 20 000 bázispár, ez jut be a gazdasejtbe a fertőzést követően, majd stabilan beépül a növényi kromoszómába.

A sejtburjánzás mellett olyan aminosav származékokat termeltet a növényvel, amelyeket az *Agrobacterium* tápanyagként hasznosít, emellett olyan növényi hormonanalógok képződnek, amelyek a gyökér- és szárnövekedést leállítják, ezzel is előnyös a tumorsejtek növekedésének.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

17

Génátvitel a Ti plazmiddal

A Ti plazmidok alkalmasak arra, hogy vektorként szolgáljanak „idegen” DNS szakaszoknak a gazda növények kromoszómáiba történő beviteléhez.

Ha a T-DNS szakaszba a tumorindukáló gének helyére más géneket építenek be, azok éppúgy integrálódnak a növényi genomba. E rendszer felhasználásával a növények gyakorlatilag bármely génnel transzformálhatók.

A genomba juttatandó T-DNS szakaszokba általában rezisztencia géneket is elhelyeznek, ami lehetővé teszi a transzformáns növények egyszerű szelektálását.

Növényeknél értelemszeresen az antibiotikum rezisztencia helyett herbicid rezisztencia géneket alkalmaznak.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

18

A T-DNS felépítése

Határoló régiók: ezek a T-DNS „jobb és bal oldali” végei, amelyek a kromozómába való integrálódáshoz nélkülözhetetlenek.

- Ezen belül: expressziós kazetta, az elején promóter, a végén terminátor régióval, melyek a gén működését, expresszióját (kifejeződését) teszik lehetővé.
- Ezen belül:
 - szelekciós marker gén (antibiotikum- vagy herbicid-rezisztencia gén), és a
 - hasznos gén (egy hasznos növényi tulajdonság génje, amit be akarunk vinni a növénybe)



Növényregenerálás

A Ti plazmidokkal be lehet vinni géneket a növényi sejtekbe, de ezek a gének nem jelennek meg az egész növényben, csak a tumorsejtekben, és nem öröklődnek. Ahhoz, hogy minden sejtben megjelenjen, öröklődő tulajdonságot kapjunk, ki kell emelni egy tumorsejtet, és abból regenerálni a teljes növényt.

(A protoplaszt-fúziónál már említettük, hogy ez kivitelezhető.)



Növényregenerálás

A növényeknél egy sejtől vissza lehet nevelni az egész növényt, a tumorsejtől kiindulva is regenerálható szaporodóképes növény.

