# 4. Sejttenyészetek fenntartása, manipulálása

A molekuláris biológiai módszerek alkalmazása során gyakran szükségünk van valamilyen élő organizmusra, vagy sejtekből álló kultúrára. Az élő sejtek felhasználhatóak lehetnek adott makromolekulák izolálására, makromolekulák hatásainak *in vivo* (élő rendszeren belüli) vizsgálatára, vagy makromolekulák célzott szaporítására, termeltetésére. Ebben a fejezetben az élő rendszerek fenntartásával, szaporításával, esetleges átalakításával kapcsolatos technikákról lesz szó. Csak a molekuláris biológiában leggyakrabban használt rendszereket ismertetjük, a módszerek közti átfedéseket igyekszünk minimalizálni.

**4.1. Baktériumok**

A baktériumok szinte minden klasszikus molekuláris biológiai módszerekkel végzett kutatás elengedhetetlen organizmusai. Elsősorban nukleinsavak sokszorosításában és fehérjék termeltetésében használjuk őket. A legjobban karakterizált és a leggyakrabban használt faj az *Escherichia coli* bélbaktérium (4-1. ábra). Az *E. coli*nak igen sok törzse van, nagy részüket mesterségesen állították elő egy már ismert törzs genetikai módosításával. Az így előállított törzsek **nem patogének**, nem kell attól félni, hogy a velük dolgozókat megfertőzik, megbetegítik. A vad típushoz képest különböző mértékben lehetnek **mutánsok**. A mutáció többnyire **valamilyen enzim**, például endonukleáz, proteáz, metiláz, rekombináz, a DNS hibajavító vagy a metabolikus utak valamilyen enzimének defektusát, **hiányát eredményezi**. Az egyes törzsek tartalmazhatnak extrakromoszómális DNS-t is (plazmidot), melyek extra tulajdonságot biztosítanak a baktériumoknak (például valamilyen antibiotikum elleni rezisztenciát kódoló géneket tartalmaznak). Az egyes törzsek genetikai hátterét mindig ismernünk kell, hogy adott feladatra való alkalmasságukat ellenőrizni tudjuk.

4-1. ábra

http://healthdefine.com/wp-content/uploads/2011/06/o157-h7-e.-coli.gif

2013.08.27.

http://www.niaid.nih.gov/SiteCollectionImages/topics/biodefenserelated/e\_coli.jpg

2013.08.27.

**4.1.1. Baktériumok tenyésztése**

A baktériumokat **folyadékkultúrában** és szilárd táptalajon (**agarlemezen**) is lehet tenyészteni, 37 ºC optimális hőmérsékleten. *E. coli* tenyésztéséhez a szükséges tápoldathoz triptont (tripszinnel emésztett kazeint), élesztőből készített extraktumot és NaCl-ot szoktak adni, szilárd lemez készítése esetén ezt 1,5% agarral egészítik ki. 121 ºC-on, magas nyomáson történő **autoklávozással sterilizálhatjuk** a tápoldatot.

A folyékony kultúrában lévő baktériumokat hígítás után tudjuk agarlemezekre széleszteni. A lemezekről a baktériumokat aztán új lemezekre vagy folyadékkultúrába olthatjuk. A folyadékkultúrában tenyésztett baktériumokat gyorsan fel kell használni a kísérletekhez, míg az agarlemezeken (plate-eken) tenyésztettek 4 ºC-on tárolva egy hónapig is életképesek maradnak. Hosszabb ideig tartó tároláshoz más módszer kell: a sűrű baktérium-szuszpenziót 15-20% glicerinnel egészítjük ki, szuszpendálás után mélyfagyasztásnak ellenálló steril műanyag csövekbe töltjük, majd szárazjégen hűtött alkohollal -70 ºC-ra hűtjük. A csöveket ezután -70 ºC-os hűtőben tároljuk.

4-2. ábra

http://2007.igem.org/wiki/images/8/88/Ecoli.jpg

2013.08.27.

**4.1.2. Baktériumok transzformálása**

**Transzformálásnak** hívjuk azt a folyamatot, amikor **idegen DNS**-t juttattunk a baktériumokba. A hatékony transzformációhoz a baktériumok **sejtfalát** megfelelően **átjárhatóvá** kell tenni, anélkül hogy a baktérium elpusztulna (ezt a módszert úgy hívják, hogy „**kompetenssé**” teszik a sejtet). A transzformálás jellegének megfelelően alapvetően két fajta: **kémiai**, vagy **elektrokompetens sejteket** készíthetünk.

Baktériumsejtek „kompetenssé” tétele során a baktériumokat középső-késő logaritmikus növekedési fázisig (OD600=0,4-0,6) szaporítják, majd centrifugálással ülepítik őket. **Elektrokompetens sejtek** készítésekor a baktériumokat többször jéghideg desztillált vízzel mossák, majd a sűrű szuszpenziót összekeverik a bejuttatni kívánt DNS-sel. Ezt a keveréket steril **elektroporációs küvetta** (4-3. ábra) aljába töltik buborékmentesen, majd rövid ideig elektromos feszültséget kapcsolnak rá. A feszültség következtében a baktériumok sejtfala átjárhatóvá válik a DNS számára. **Kémiailag kompetens** sejtek készítésekor a baktériumokat centrifugálás után különböző oldott sókat (CaCl2, MgCl2, MnCl2, KCl, polietilén-glikol) tartalmazó pufferekben mossák, többször egymás után. Többféle módszert dolgoztak már ki kémiailag kompetens sejtek készítésére, amelyek a baktériumok szaporításának módjában, illetve a mosópufferekben lévő ionösszetételükben különböznek egymástól. Leggyakrabban CaCl2-dal kompetenssé tett sejteket használnak transzformációhoz, mert ezeket a legkönnyebb előállítani. A kompetens sejteket nem szükséges azonnal felhasználni: 7,5% dimetil-szulfoxid (DMSO), vagy 15% glicerin hozzákeverése, majd folyékony nitrogénben fagyasztás után **alikvotokban** (több részre szétosztva) érdemes tárolni -70 °C-on. A kémiai kompetens sejtekkel nem elektroporáció, hanem **hősokk** segítségével transzformálnak. A kompetens sejtekhez (ha tárolva voltak, azok jégen történő olvasztás után) keverik a bejuttatni kívánt DNS-t, majd jégen történő, kb. 30’ inkubáció után 30–60 másodpercig (leggyakrabban **45 másodpercig**) 42 °C-os vízfürdőbe helyezik a csöveket. A hősokk után a mintát jégen hűtik, majd tápoldat hozzáadása után 45 percig kevertetve inkubálják a kultúrát 37 °C-on. Ezalatt a bejutott sejtek a sokkot követően regenerálódnak és a DNS-ről elkezdenek átíródni azok a gének, melyek az antibiotikum-rezisztenciát okozzák. Ezután a sejteket ülepítik, majd a megfelelő antibiotikumot tartalmazó lemezekre szélesztik őket (többnyire 2-3 darab lemezre, egy-egy nagyságrenddel különböző baktériumkoncentrációban). A lemezeken csak az antibiotikum-rezisztens (az idegen DNS-t hordozó) baktériumokból nőnek ki kolóniák.

4-3. ábra

http://www.bio-rad.com/webroot/web/images/lsr/products/gene\_transfer\_rnai/sku\_view/global/165-2089\_view.jpg

2013.08.27.

DNS baktériumba juttatására a fent leírt módszereken kívül van egy további lehetőség is, a **virális transzdukció**. Ilyenkor a baktériumot fertőzni képes **bakteriofág** kapszidjába kell az idegen (vagy részben idegen) DNS-t csomagolni. A fág fertőzésekor annak genetikai anyaga (itt az idegen DNS) bejut a baktériumsejtbe.

Az idegen DNS-darabok rendszerint tartalmaznak egy olyan gént is, amely kifejeződve rezisztenssé teszi az adott baktériumot bizonyos sejttoxinokra (**antibiotikum-rezisztencia** gén). A sejttoxint adagolva csak azok a baktériumok maradnak majd életben, amelyek az idegen DNS segítségével védekezni tudnak a toxinok ellen, ezért ez a DNS-szakasz nem tűnik el a baktériumok osztódása során.

**4.2. Élesztőgombák**

Az élesztőgombafélék családjának tagjai igen változatos megjelenési és alkalmazkodási formákkal bírnak. Közülük legismertebb, a sejt- és molekuláris biológiában leginkább tanulmányozott egysejtű gomba a sörélesztő (***Saccharomyces cerevisiae***) (4-4. ábra). Fehérjeexpresszióhoz manapság leginkább egy másfajta élesztőt, a metanol-metabolizáló Pichia fajok egyikét (***Pichia pastoris***, ***Pichia methanolica***) használják.

4-4. ábra

http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/yeast.jpg

2013.08.27.

http://www.uwyo.edu/virtual\_edge/lab13/images/saccharomyces\_cerevisiae.jpg

2013.08.27.

**4.2.1. Élesztőgomba tenyésztése**

Az élesztőt a baktériumokhoz hasonlóan **folyadékban** és **lemezen** is lehet tenyészteni, 28-30 ºC maximális hőmérsékleten. A szükséges tenyésztési, átoltási, tárolási technikák nagyban megegyeznek az *E. coli*nál olvashatókkal. Az eukarióta sejtek szaporodása lassabb a prokariótákénál; mind folyadékkultúrában, mind agarlemezen lassabb növekedést tapasztalunk. A szélesztés után a gombatelepek például csak **3-4 nap** növekedés után láthatóak jól szabad szemmel. A baktériumokhoz hasonlóan a molekuláris biológiában szintén **mutáns vagy transzgenikus** élesztőtörzseket használnak. Leginkább **aminosavak** és **nukleotidok** szintéziséhez szükséges **enzimek** génjei vannak kiütve ezekben a törzsekben, így ezek az enzimdeficiens törzsek csak a megfelelő aminosavakat, ill. szerves bázisokat tartalmazó tápoldatban képesek életben maradni és szaporodni.

A vad típusú törzseket ún. **minimál médiumon** is tudjuk tenyészteni, amelyben megtalálhatóak a szükséges **sók** és **vitaminok**, **foszfátionok**, **szénforrás** (pédául glükóz formájában) és **nitrogénforrás** (ammónium-szulfát formájában). Az előbb említett mutáns törzsek nem képesek minimál médiumon szaporodni, ezért megfelelő aminosav- és nukleotid-forrásról kell gondoskodnunk. Ilyenkor legtöbbször élesztő-extraktumot és előemésztett, oligonukleotidokból és aminosavakból álló állati fehérjemaradékot (**peptont**) szoktak a tenyésztőmédiumba tenni. Ha egyes aminosav-metabolizmusban részt vevő enzimek jelenlétére akarunk szelektálni (amelyek génjét transzformálással juttathatjuk be a mutáns élesztősejtbe), akkor minimál médiumot alkalmazunk ún. **dropout mix**-szel kiegészítve. Ez a keverék tartalmaz minden szükséges aminosavat és szerves bázist, kivéve azokat, amelyekre az adott kísérletben szelektálnunk kell. Ezen a módon mutathatjuk ki, hogy az általunk az élesztőbe juttatott genetikai anyag tartalmazza-e a metabolizmushoz szükséges enzimeket.

Az élesztősejtek 4 ºC-on, agarlemezen tárolva több hónapig is életképesek maradnak. Hosszabb ideig tartó tárolásuk a baktériumsejtekhez hasonlóan (-70 ºC-on) történik.

**4.2.2. Élesztő transzformálása**

Az élesztősejtek transzformálása hasonlít a baktériumok **hősokkal** történő transzformálására, de annál kissé bonyolultabb és jóval időigényesebb folyamat. Itt is többféle módszert dolgoztak már ki, a legáltalánosabban használt módszer szerint **polietilén-glikolt**, **lítium-acetátot** és **egyszálúsított** (többnyire lazac spermából izolált) **DNS-t** használnak a transzformáció hatékonyságának a növelésére.

Az éjszaka során felszaporodott élesztő-sejtkultúrát reggel ki kell hígítani (OD600=0,1-re), majd 2-3 osztódási ciklust kell várni (ez élesztőknél elég lassú, 3–5 óra hosszat tartó folyamat (OD600=4,5-5-ig). A sejtek ülepítése után hideg desztillált vízzel történő, többszörös mosás következik. A mosások után az élesztősejteket tartalmazó pelletet egy polietilén-glikolt (PEG), lítium-acetátot (LiAc) és egyszálúsított ún. carrier DNS-t tartalmazó mix-szel keverik össze, ehhez adják majd a transzformálni kívánt DNS-t. Alapos rázás után következhet a 42 °C-os hősokk, az élesztőtörzstől függően 15–45 percig. Tenyésztő médium (YPD) hozzáadásával és kb. 1 órán át tartó kevertetéssel szokták a hősokk után az élesztők normális metabolizmusát visszaállítani. A sejtek összegyűjtése után szokták a transzformánsokat megfelelő aminosav-hiányos lemezekre széleszteni.

Az aminosav-szintézishez szükséges enzim génjét tartalmazó, idegen DNS-darabot hordozó élesztők túlélnek, utódaik kolóniát alkotnak. Az élesztők transzformációs **hatékonysága** jóval (akár 3-4 nagyságrenddel) **alacsonyabb**, mint a baktériumoké.

**4.3. Sejtkultúra állatokból**

Az állati (emberi) szervezet szöveteiből alapvetően háromféle sejtkultúra származtatható:

1. Az **immortalizált** sejtek valamilyen malignus (rákos) szövetekből származnak. Ezek a sejtek (általában genetikai mutációk következményeként) elvesztették a korlátlan szaporodást gátló mechanizmusuk néhány fontos elemét. Előnyük, hogy bár legtöbb tulajdonságukban hasonlatosak az adott szövet differenciálódott sejtjeihez, **korlátlan szaporodásuknak** köszönhetően **hosszú időn át** fenntarthatóak, **tenyészthetőek**. A fontosabb sejtvonalak **jól karakterizáltak**, bárki számára megvásárolhatóak, a velük végzett kísérletek eredményei más kutatócsoportok eredményeivel könnyen összevethető. Hátrányuk, hogy azért nem minden tulajdonságunk hasonló az egészséges sejtekhez, ezért a sejtek vizsgálatakor kapott kísérlet eredmények nem mindig extrapolálhatóak az egészséges szövet működésére (4-5. ábra).

4-5. ábra

http://www.microscopyu.com/galleries/dicphasecontrast/images/helapc.jpg

2013.08.27.

2. Az **őssejtek** vagy korai embrióból, vagy már kialakult szövetekből nyert pluripotens sejtek leszármazottai. Ezeknek a sejteknek a differenciáltsági foka igen kicsi, a legtöbb differenciált testi sejtre jellemző, osztódást gátló mechanizmus még nem alakult ki bennük. Őssejteket elsősorban differenciációs, regenerációs kísérletekhez használnak, az elhalt szövetek újraépülését remélik jövőbeli terápiás alkalmazásuktól.

3. Primer **sejtkultúrák** mindig újonnan izolált állati sejtekből származnak, a sejtek kevésszer vagy ritkán szaporodnak, **eltarthatóságuk** legtöbbször **néhány nap** (vagy hét). Ebből következik, hogy primer sejteken a kísérleteket nagyon jól kell időzíteni, és az izolálást követően lehetőleg mindig ugyanabban az időpontban elvégezni. A primer sejtkultúra előnye, hogy sejtjeinek működése nagyon hasonlatos az élő szövetéhez, és bármely állat bármely általunk választott szövetét vizsgálhatjuk *in vitro* (az élő szervezeten kívül).

**4.3.1. Állati sejtek tenyésztése**

A sejttenyészetek a sejttípustól függően lehetnek **folyadékkultúrák**, vagy **letapadó sejtek**. A táptalajnak tartalmaznia kell **sókat**, **vitaminokat**, **aminosavakat**, valamilyen **szénforrást** (többnyire glükózt), és valamilyen (pl. bikarbonátos) pufferrendszert. Kiegészítőként sokszor használnak extra glutamint, piruvátot, **antibiotikumokat** és **antimikotikumokat** (utóbbi kettőt a bakteriális, illetve gombafertőzések elkerülése ellen). A sejtek életben maradásához folyamatos szignálokat, ún. túlélési jelet kell biztosítani. Ezért **emlőssejt-tenyészetben** a médiumhoz 10%-ban újszülött borjú vérszérumát (**FBS**) adagolják. A tápoldat kémhatásának esetleges változását (többnyire savasodás) a hozzákevert fenolvörös indikátor színváltozásával (sárgára) követhető nyomon. Emlőssejteket többnyire 37 ºC-t, 5% CO2-t és magas páratartalmat biztosító inkubátorokban tenyésztenek (4-6. ábra).

4-6. ábra

https://www1.imperial.ac.uk/resources/6BE0D194-58A2-41D4-B0C3-3206251512F4/cell\_culture\_mol\_tox\_1\_191\_196.jpg

2013.08.28.

Mivel az izolált sejtek immunrendszer hiányában rendkívül könnyen elfertőződhetnek, a megfelelő sterilitást folyamatosan biztosítanunk kell. A médium összetevőit lehetőleg sterilen érdemes vásárolni, ha ez nem lehetséges, akkor a kész médiumot sterilre kell szűrni. Gumikesztyűben, mindig steril pipettákkal és edényekkel dolgozzunk, a flaskákat kizárólag steril, folyamatos légáramlást biztosító, ún. lamináris fülkében nyissuk ki (4-7. ábra). A sejtek kezelésekor, manipulálásakor is mindig steril oldatokat használjunk.

4-7. ábra

https://www1.imperial.ac.uk/resources/6BE0D194-58A2-41D4-B0C3-3206251512F4/cell\_culture\_mol\_tox\_1\_191\_196.jpg

2013.08.27.

Mivel a sejtek tápanyagaikat elhasználják, a sejtsűrűségtől függően rendszeresen cserélni kell a médiumot. Ez letapadó sejteknél igen egyszerű: A régi médiumot pipettával leszívjuk, a 37 °C-ra előmelegített újat pedig óvatosan (hogy a sejtek a folyadékárammal ne sodródjanak le a műanyagról) rátöltjük a sejtekre. Folyadékkultúránál a sejteket össze kell gyűjteni steril centrifugacsövekbe. Alacsony fordulatszámon (~200 g) történő centrifugálást követően a felülúszó eltávolítása után a sejteket új tápoldatba kell felvenni.

Ha a sejtek nagyon elszaporodtak, vagy új kultúrát akarunk indítani, akkor át kell oltanunk őket (ezt nevezik **passzálásnak**). Folyadékkultúrából a sejtek átoltása igen egyszerű: a sűrű sejtkultúrából megfelelő mennyiséget pipettázzunk át az új médiumba. Letapadó kultúránál az átoltás kissé bonyolultabb: a használt médium leszívása után a sejteket foszfát pufferrel (PBS) mossuk, majd annak eltávolítása után **tripszin-oldatot** mérünk rájuk. Néhány perces, 37 ºC-on történő emésztést követően a sejtek elvesztik tapadásukat a flaska oldalához, lekerekednek, lebegnek az oldatban. Ha az összes sejt feljött, kevés (mondjuk 10 ml) médium hozzáadásával felszuszpendáljuk a sejteket, majd az új médiumba áttesszük a megfelelő mennyiséget (többnyire néhány cseppet).

Emlőssejteket 4 °C-os hűtőben nem tudunk tárolni, hosszú távú tároláshoz a sejteket le kell fagyasztanunk. A sejteket új, kis térfogatú médiumban szokták összegyűjteni. A fagyasztómédiumnak a szokásos anyagok mellett tartalmaznia kell még 10%-nyi dimetil-szulfoxidot (DMSO) is. Gyakran extra FBS-sel (30%-ig) is ki szokták egészíteni a médiumot. A sejteket a fagyasztó médiumban felszuszpendáljuk, majd a szuszpenziót steril fagyasztócsövekbe töltjük. A **fagyasztást lassan** végezzük: Először 4 °C, utána -20 °C, végül -70 °C-ra hűtjük különböző hűtőszekrényekben és fagyasztókban. A -70 °C-ról kivett mintát folyékony nitrogénben tároljuk. A lassú fagyást elősegíti, ha a csöveket jól szigetelő hungarocell dobozba zárjuk. Ilyenkor akár közvetlenül a -70 °C-os hűtőbe is tehetjük őket. A fagyasztással szemben a sejtek **felolvasztását igen gyorsan** kell végeznünk, hogy a már kiolvadt részek ne fagyhassanak vissza. Ezt vagy 37 °C-os vízfürdőbe merítéssel, vagy a meleg tenyerünkben történő görgetéssel, rázogatással oldjuk meg. A felolvadt sejteket le kell centrifugálni, majd a fagyasztófolyadék eltávolítása után felvehetjük őket a szokásos tápfolyadékukban.

Ha arra vagyunk kíváncsiak, hogy két különböző sejt milyen hatással van egymásra az általuk termelt hormonokon vagy anyagcseretermékeken keresztül, akkor **ko-kultúrát** hozhatunk létre. Ilyenkor a kétféle (például a különböző szövetekből származó) sejtet tartalmazó médium csak egy vékony hártyával van elválasztva, amelyen a sejtek nem tudnak átjutni, viszont a folyadék és a benne oldott anyagok közlekedhetnek az eltérő sejttípusok között.

Előfordulhat az az eset is, hogy egy összefüggő szövetet próbálunk meg mesterséges táptalajban fenntartani. Ezek az állatokból **izolált szövetek** néhány napig fenntarthatóak károsodás nélkül.

Ha immortalizált limfocitákat és B-sejteket fúzionáltatunk, ún. **hibridoma sejteket** kapunk. Ezeket a sejteket monoklonális antitestek készítésére szokták felhasználni (lásd: 14. fejezet).

**4.3.2. Állati sejtek transzfektálása**

Állati sejtekbe könnyebb bevinni idegen DNS-t, mint sejtfallal rendelkező sejtekbe. A sejteket nem kell kompetenssé tenni a transzfekció előtt. Többféle kémiai és nem-kémiai módszert is kifejlesztettek, ezek közül a legfontosabbak:

1. Igen finom **kalcium-foszfát csapadékhoz** kapcsolódva a DNS még nem teljesen ismert mechanizmussal jut át a sejtmembránon.

2. A **liposzómák** piciny lipidmembránnal határolt zsákocskák, amelyek könnyen fuzionálnak a sejtmembránnal. A liposzómába csomagolt DNS így könnyen bejuthat a sejt belsejébe.

3. **Elektroporáció** során az alkalmazott elektromos feszültség teszi átjárhatóvá a sejtmembránt.

4. **Virális transzdukcióval** is be lehet juttatni idegen DNS-t, ha azt előzőleg a sejtkultúrát fertőzni képes vírus kapszidjába juttatták.

A transzfektált DNS többnyire nem épül be a gazdasejt genomjába. A transzfektált sejtekkel végzett kísérletek egy részében ez nem is probléma, az ilyen **tranziensen transzfektált** sejtek is ki tudják fejezni a bejuttatott idegen DNS-ről (**episzómáról**) a szükséges fehérjét. Bizonyos virális replikációs origókat tartalmazó episzómák megfelelő virális fehérjéket expresszáló sejtekben képesek replikálódni, így az utódsejtekbe kerülni. Ha az idegen DNS beül a gazdasejt genomjába, akkor azt a sejtet **stabil transzfektánsnak** hívjuk. A stabil transzfektánsokat szelektálni tudjuk az idegen DNS-sel bevitt markergén segítségével.

**4.4. Növényi sejtkultúra**

A növényi rügyekből vagy gyökércsúcsból lehetséges **totipotens sejteket** izolálni. Ezekből a sejtekből tudunk szilárd agarlemezen, vagy folyadékban szaporodni képes sejtkultúrát növeszteni. A médiumba **inorganikus sókat**, **vitaminokat,** növényi **hormonokat** és szerves anyagokat kell tenni. A szuszpenziós kultúrát általában 22 °C-os inkubátorban, rázatás mellett tenyésztjük. Agarlemezen ún. **kallusz** nő a sejtekből, ami egy amorf sejtmassza (4-8. ábra). Kallusz viszonylag hosszabb ideig tárolható szobahőmérsékleten. Hogy a sejtek genetikai megváltozását, vagy a fertőzésveszélyt elkerüljék, gyakran mélyfagyasztva is tárolják a sejteket. A jég tönkreteszi a sejtfalat, ezért vagy **magas só-koncentráció** alkalmazásával, vagy **dehidratálással** ezt meg kell akadályozni. A fagyasztást megelőzően a sejteket krioprotektív anyagokkal hosszabb ideig inkubálják, majd nagyon lassan, kontrolláltan hűtik le a sejteket. A fagyott sejteket folyékony nitrogénban tárolják.

4-8. ábra

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/18/Callus1.jpg

2013.08.27.

**4.4.1. Transzgének növényi sejtekbe juttatása**

A növényi sejtek sejtfala miatt a szokásos transzformációs technikák nem működnek. Az egyik módszer szerint a transzgént tartalmazó plazmidot egy fém (gyakran arany) nanorészecske felületére kötik, úgy „lövik” a sejtmagba (egy ún. **génpuskával**). A másik lehetséges út, hogy a sejtfalat enzimekkel leemésztik, és a megmaradt ún. **protoplasztot** transzformálják konvencionális módokon, például elektroporációval. Gyakran használnak baktérium (pl. ***Agrobacterium tumefaciens***) közvetítésével létrejött géntranszfert is.

**4.5. Vírusok**

A vírusok nem tekinthetőek valódi élőlényeknek, hiszen nincs saját metabolizmusuk. Elsősorban, mint **vektorok** játszanak fontos szerepet, vagyis idegen DNS-t képesek nagy hatékonysággal az adott célsejtbe juttatni. A bakteriális vírusokat **bakteriofágoknak** (vagy rövidítve: fágoknak) hívjuk. A fágok saját genetikai állományának egy részét kicserélve tudjuk a kívánt szekvenciákat a baktériumokba juttatni. A rovarsejtek fertőzéséhez gyakran **bakulovírusokat** használunk. Emlőssejtekbe a legismertebb virális transzporterek a **lentivírusok** és az **adenovírusok**. A fertőzésveszély elkerülése végett utóbbi kettővel csak igen nagy körültekintéssel, megfelelően felszerelt laboratóriumban szabad dolgozni.