

GEENITEKNIIKAN PERUSASIOITA

GEENITEKNIikka ON BIOTEKNIKAN OSA-ALUE!

Biotekniikka tutkii ja kehittää elävien solujen, solun osien, biokemiallisten menetelmien sekä molekyylibiologian uusimpien menetelmien käyttösovelluksia.

Geenitekniikan perusta on geenien kemiallisen rakenteen ja geneettisen koodin yleismaailmallisuus

*** kaikilla eliöillä geenien DNA:n emäsjärjestys kopioituu lähettiRNA:ksi, joka ohjaa proteiinien synteesiä**

Kehityksen virstan pylväitä:

1680-luku	Bakteerit löytyivät
1860-luku	Sterilointi keksittiin
1880-luku	Bakteerien puhdasviljelmät kehitettiin
1890-luku	Virukset löytyivät
1911	Ensimmäinen syöpävirus löytyi
1915-1917	Bakteriofagit löytyivät
1928	Ensimmäinen antibiootti (penisilliini) löytyi
1930-luku	Bakteerien transformaatio selvitettiin; virusten kasvatustekniikat kehitettiin
1944	Perintöaineksen todettiin olevan DNA:ta
1950-60-luvut	Geenien perustoiminnot selvitettiin; useat DNA:han vaikuttavat entsyymit löydettiin
1970	Ensimmäiset DNA:n pilkkomiseen sopivat entsyymit ja käänteiskopioijaentsyymi löydettiin.
1973	Ensimmäiset vieraat geenit siirrettiin bakteeriin
1977	Bakteerissa tuotettiin ensimmäinen ihmisproteiini
1982	Syöpägeenien merkitys selvitettiin
1986	Ensimmäinen yhdistelmä-DAN-rokote (hepatiitti B) tuli markkinoille.
1990	Kansainvälinen ihmisen genomihanke alkoi (15-vuotissuunnitelma, ihmisen perimän kartoitus- ja sekvensointihanke)
1995	Esitumallisen solun koko perintöaineksen emäsjärjestys selvitettiin ensimmäistä kertaa (Haemophilus influenza –bakteeri)
1996	Tumallisen solun perintöaineksen emäsjärjestys selvitettiin ensimmäistä kertaa (leiviniiva, Saccharomyces cerevisiae)
2003-2004	Ihmisen genomihanke valmistuu etuajassa (ennustetut 80 000 -100 000 geeniä muuttuu 20 000- 25 000 geeniksi)

* **Geenien perusrakenteet selvitettiin mikrobeja tutkimalla**

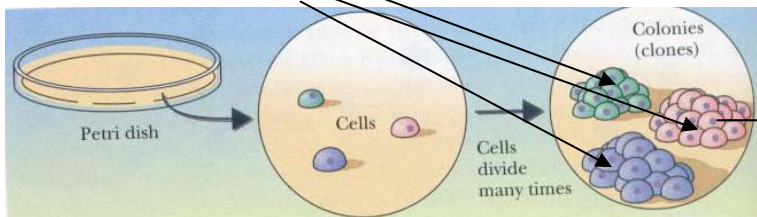
* **Moderni biotekniikka hyödyntää muokattuja mikrobeja**

* **Muokausvälineet mikrobeista** => entsyymit bakteerien selviytymiskeinoja
=> plasmidit bakteerien DNA:ta
=> virusvektorit virusDNA:ta
=> solu- ja viruskannat

Terminologiaa

Klooni = saman perimän omaavien eliöiden joukko, joka yleensä on syntynyt yhdestä ja samasta solusta (tai yksilöstä) suvuttoman lisääntymisen seurauksena

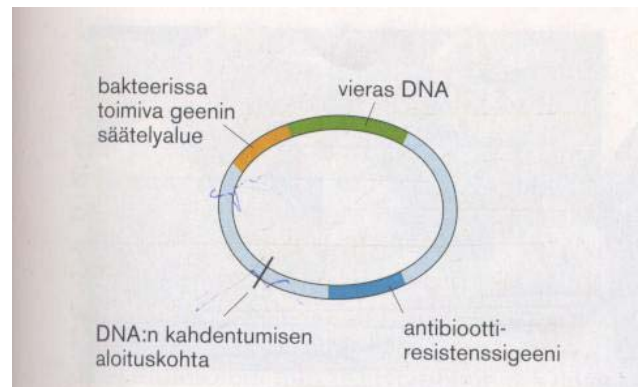
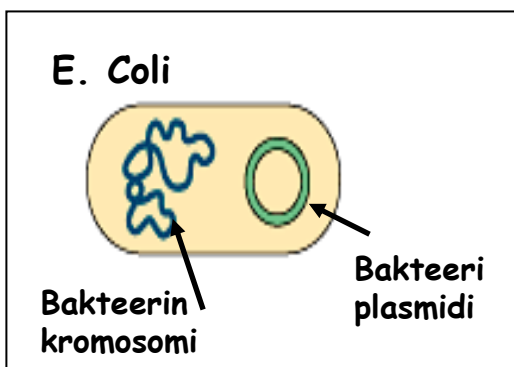
Bakteeriklooni:



Massakasvatus koeputkessa
=> DNA:n / geenin puhdistus ja analysointi

Kukin yksittäinen bakteeri jakautuu n kertaa ja tuottaa oman klooninsa jälkeläisiä

Kloonaamista varten geeni liitetään osaksi bakteerissa olevaa **plasmidi-DNA:ta**, joka siirretään bakteeriin monistumaan bakteerikloonissa



Yhdistelmäplasmidi

Kloonaus geenitekniikassa tarkoittaa käytännössä geenin monistamista(=lisäämistä) bakteerissa ja eristämistä siitä. Yleensä sisältää myös kloonatun geenin emäsjärjestyksen määrittämisen = **molekyyliekloonaus**

Geenin kloonaminen ja analysointi

* **Geenin kloonauksen tarkoitus on tunnistaa ja puhdistaa elion muusta DNA:sta**

Geeni voidaan eristää kahdella tavalla:

1. **Geenikirjastoista**
- ei tarvita tietoa emäsjärjestyksestä

2. **PCR -monistuksella**
- tarvitaan tieto emäsjärjestyksestä

=>
Molemmat tavat tuottavat suuren määrän geeniä

1. Kloonaminen geenikirjastosta

kromosomaalisen DNA:n pilkkominen

geenikirjaston valmistaminen

geenin etsiminen geenikirjastosta

2. PCR monistus

kromosomaalisen DNA:n puhdistus

etsityn geenin monistaminen PCR-reaktiolla

monistetun geenin eristäminen

eristetty geeni

1. **Tiettyyn bakteeriyksilöön asettuneen geenin määrä lisääntyy ko. bakteerin jälkeläisjoukon eli bakteerikloonin mukana.**

=>

Koeputkeen saadaan suuri määrä bakteeria, josta DNA voidaan eristää



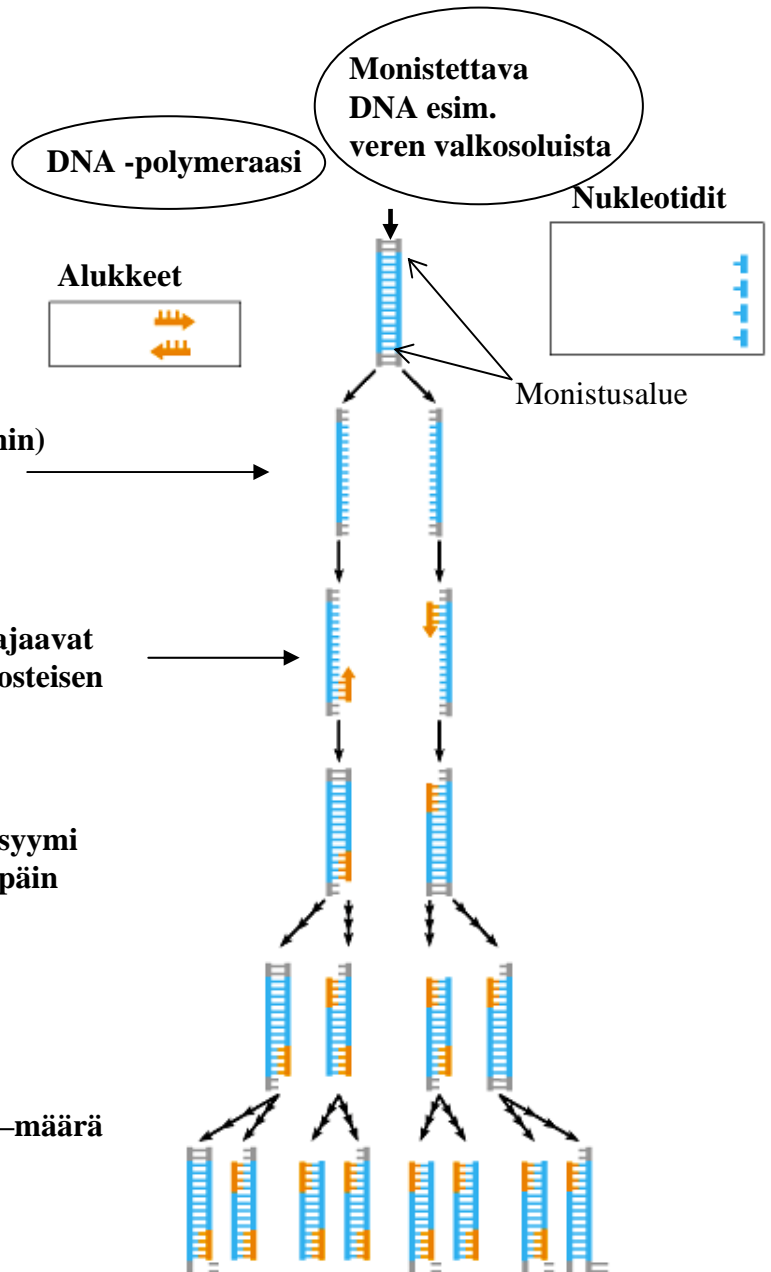
2. DNA:n kloonaminen = monistaminen polymeraasiketjureaktiolla, PCR:lla

- korvaa perinteistä kloonausta

- edellyttää tietoa geenin emäsjärjestyksestä
- tehokas ja herkkä menetelmä (muutamasta DNA molekyylistä parissa tunnissa kymmeniä jopa satoja miljoonia kopioita)

- DNA monistuu koeputkessa entsyymin avulla DNA-polymeraasi (arkkibakteereista eristetty, optimilämpötila +72 °C)

1. Lämmitys => +95 °C (1min)
=> DNA-vastinjuosteet erkanevat toisistaan
2. Jäähdytys => +55 °C
=> monistettavan alueen rajaavat alukkeet pariutuvat yksijuosteisen DNA:n kanssa
3. Lämmitys => +72 °C
=> DNA-polymeraasi entsyymi rakentaa alukkeesta eteenpäin vastinjuosteen
4. Vaiheita 1-3 toistetaan noin 20 kertaa! Jokaisessa sykissä alkuperäinen DNA-määrä kaksinkertaistuu.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Automaattinen PCR-laitte on ohjelmoitava koeputkien lämmitin!

Geenin / DNA:n eristäminen ja kloonaminen

=> mahdollistaa geenin tutkimisen ja manipuloimisen (esim.yhdisteleminen muihin geeneihin tai emäsjärjestyksen muunteleminen) perustutkimukseen tai kaupallisiin / lääketieteellisiin tarpeisiin

DNA:n käsittelyn vaiheita

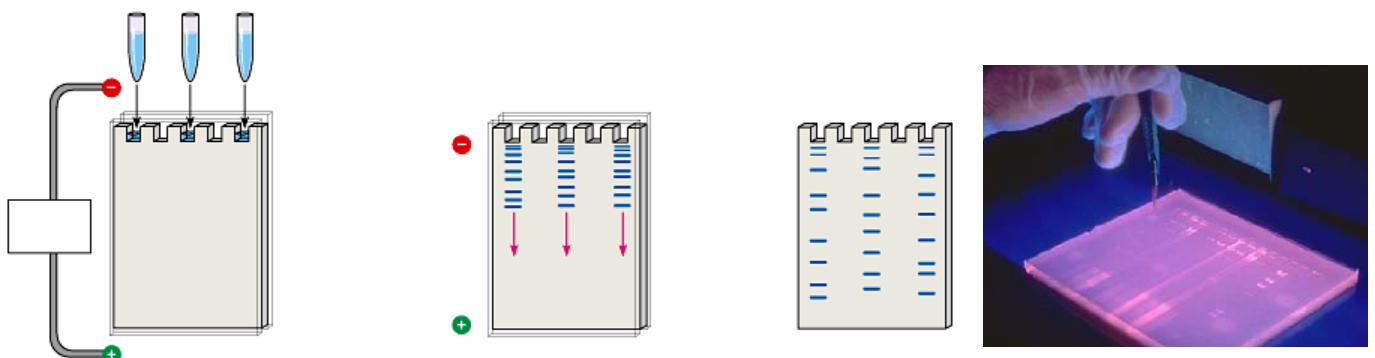
1. DNA:n eristäminen

- uuttamalla valkosoluista tai muista tumallisista soluista

2. DNA:n pilkkominen entsyymeillä

- restriktioentsyymit katkaisevat DNA:n tietyistä tunnistuskohdista
- entsyymit peräisin bakteereista, jotka käyttävät niitä tunnistamaan ja tuhoamaan vierasta DNA:ta
esim. fageista tai muista bakteereista

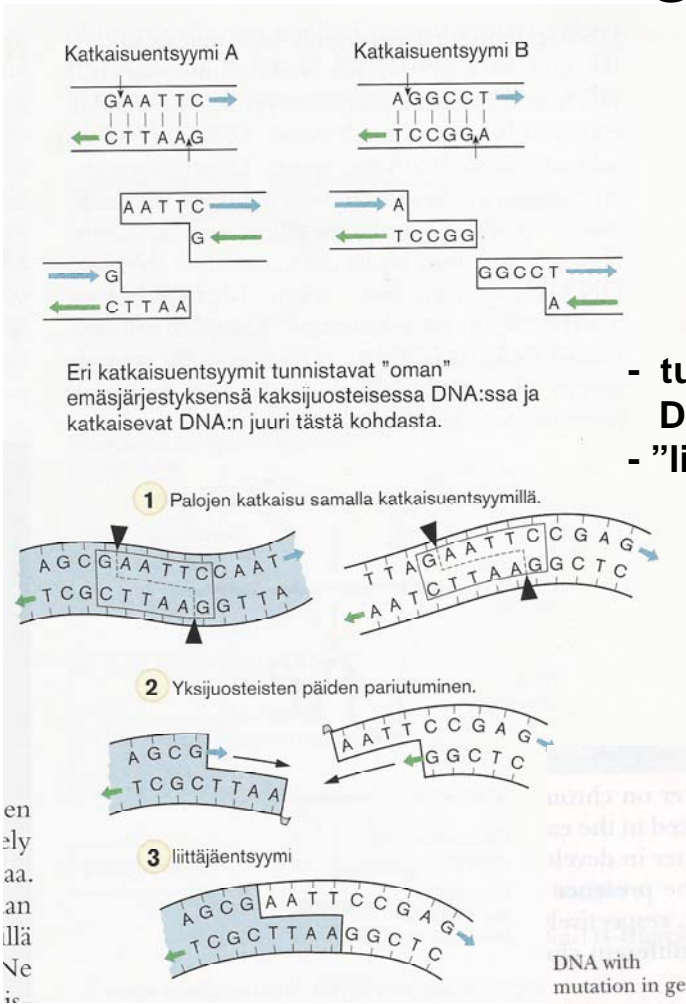
3. DNAfragmenttien elektroforeettinen erottelu



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

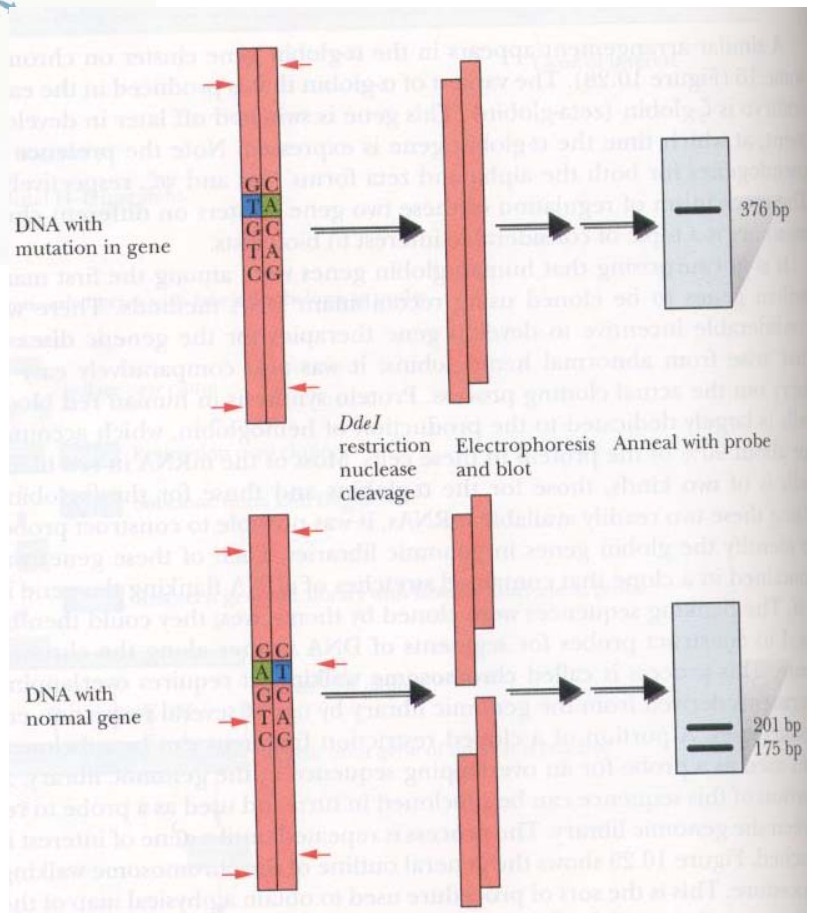
http://www.bio.davidson.edu/courses/Immunology/Flash/RT_PCR.html

DNA:ta pilkkovat entsyymit



- tunnistavat spesifin emäsjärjestyksen DNA:sta, ns.restriktiokohdan
- "liimapäät" voidaan liittää yhteen

-voidaan käyttää hyväksi yhden emäksen eroja tutkittaessa (esim. sirppisoluhemoglobiinin geeni)

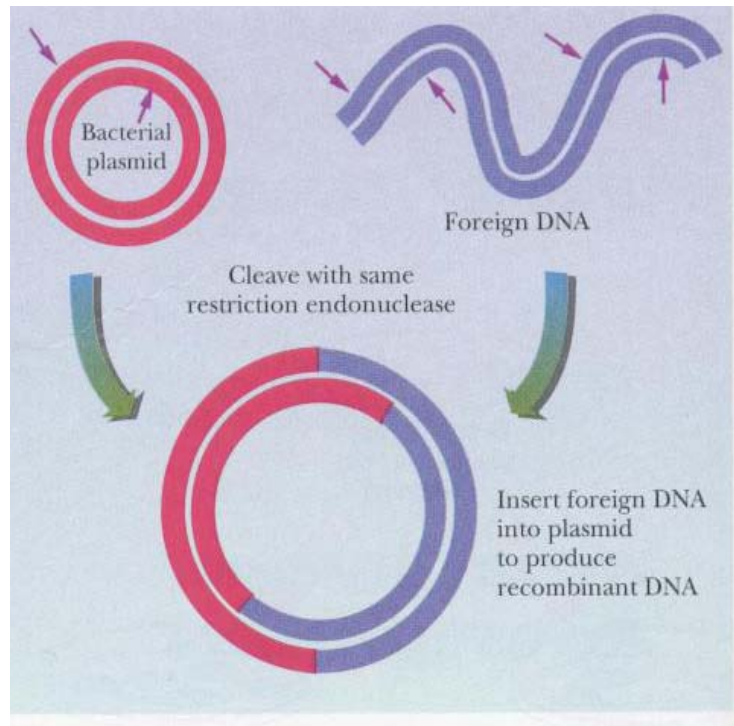


DNA:ta pilkkovat entsyymit

-katkaisukohdan ominaisuuksiin kuuluu, että samalla entsyymillä katkaistut päät voidaan liittää entsyymaattisesti yhteen

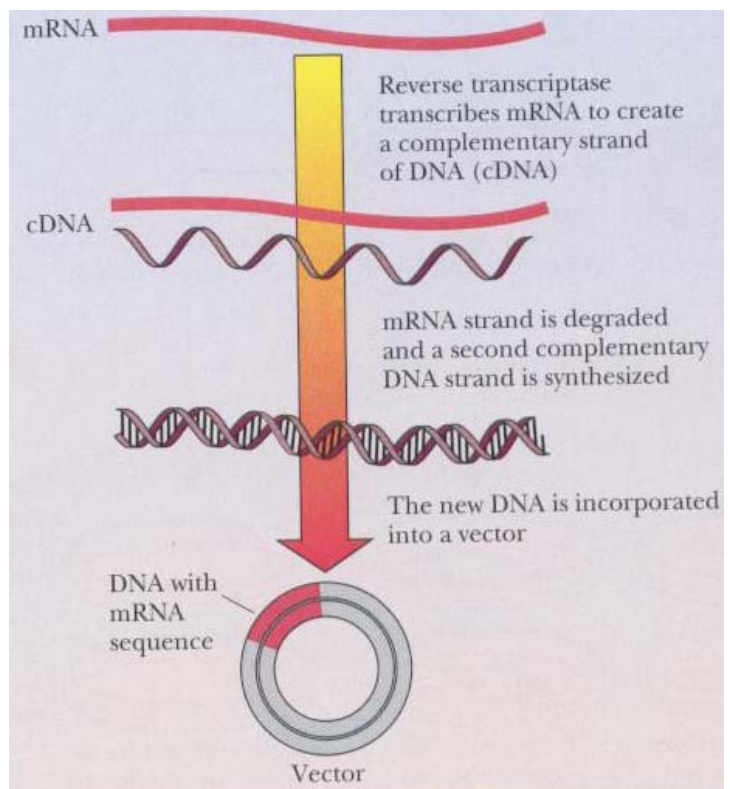
⇒ yhdistelmäDNA

= rekombinanttiDNA



- käänteiskopioija entyymi

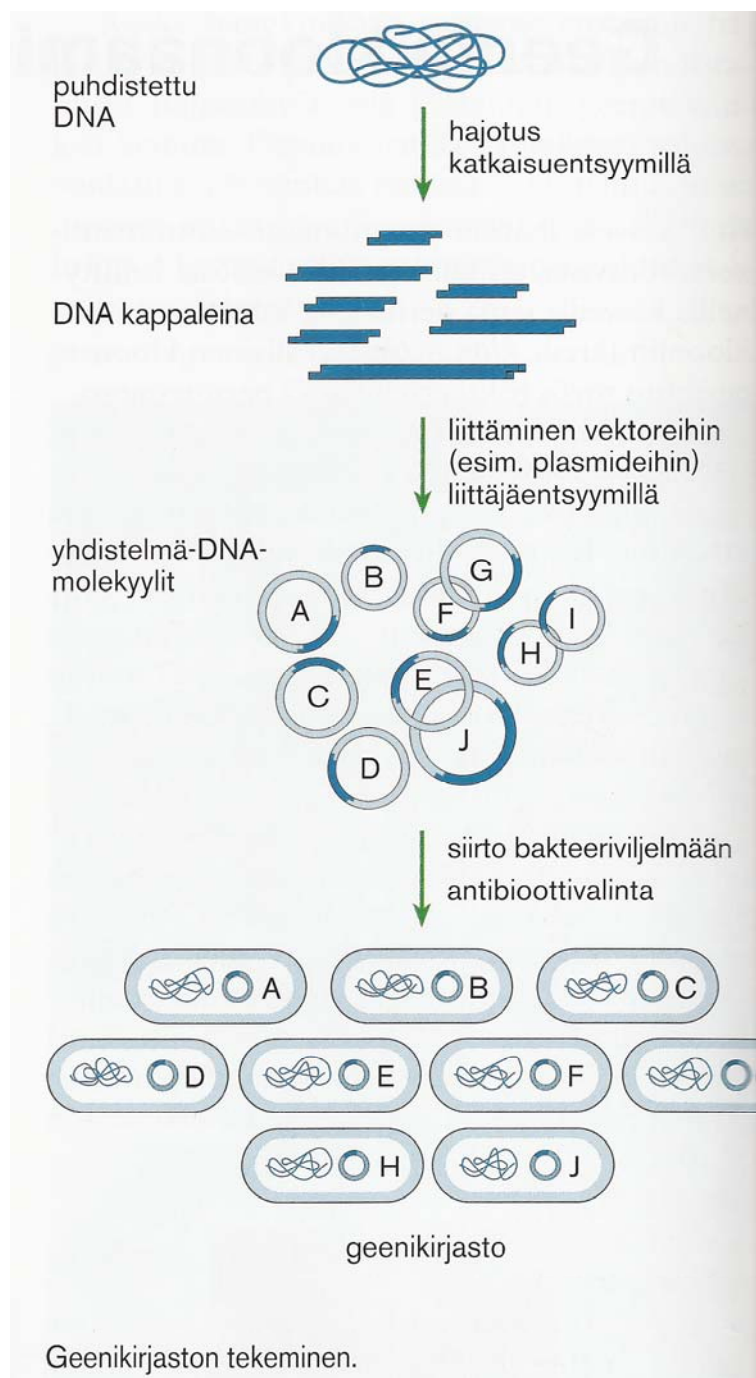
* tarvitaan, jotta bakteerisolu saadaan ilmentämään ihmisen geenejä, koska bakteereilla ei ole intronien pilkkomiseen tarvittavaa entsyymijärjestelmää



DNA:n "säilöminen" geenikirjastoon

* Geenikirjasto on koeputkessa oleva, pakastimessa säilytettävä kokoelma DNA -paloja, jotka on liitetty esim. plasmidiDNA:han tai virusDNA:han

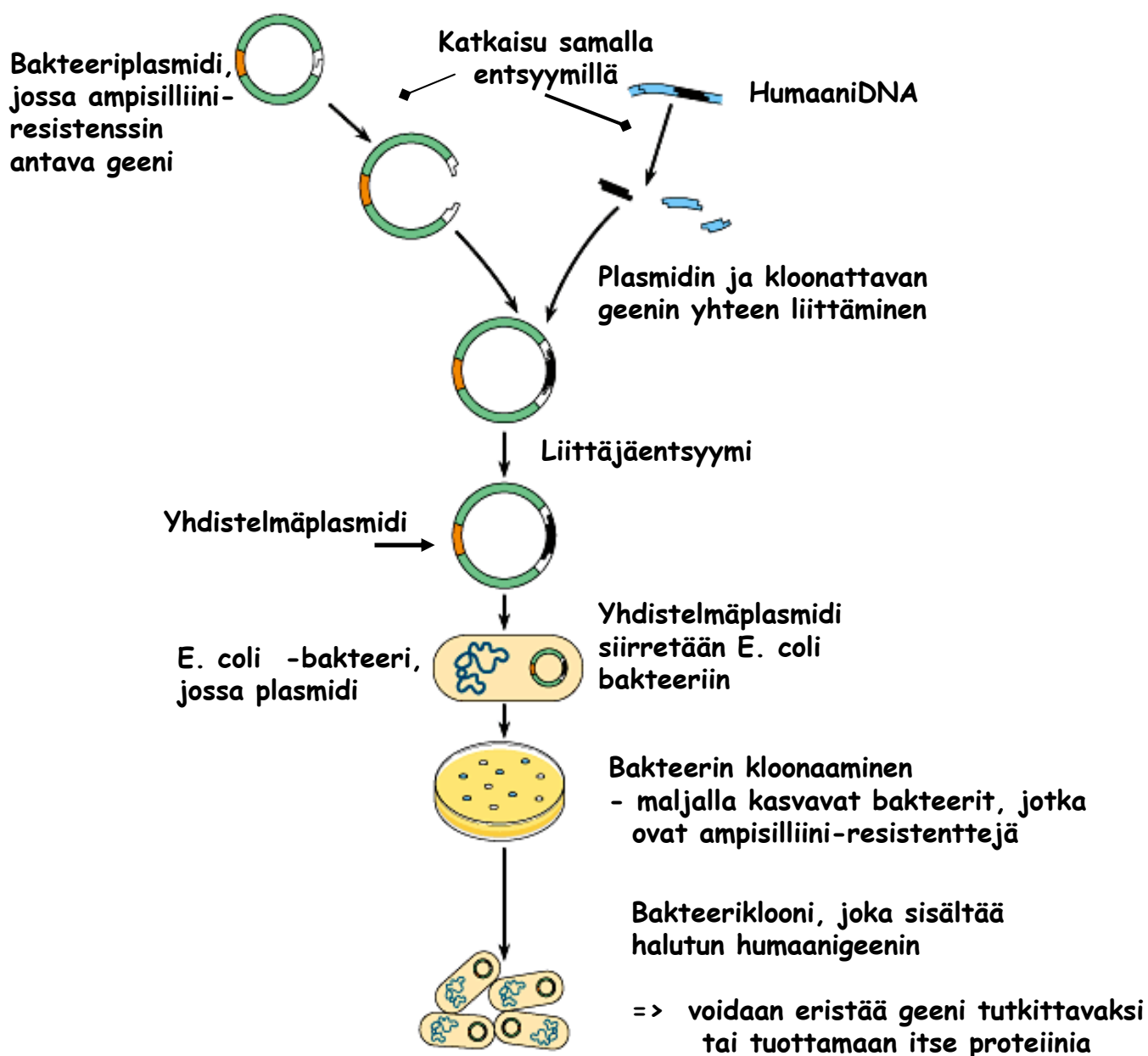
- Plasmidi ja virukset toimivat DNA -kuljettimina eli vektoreina



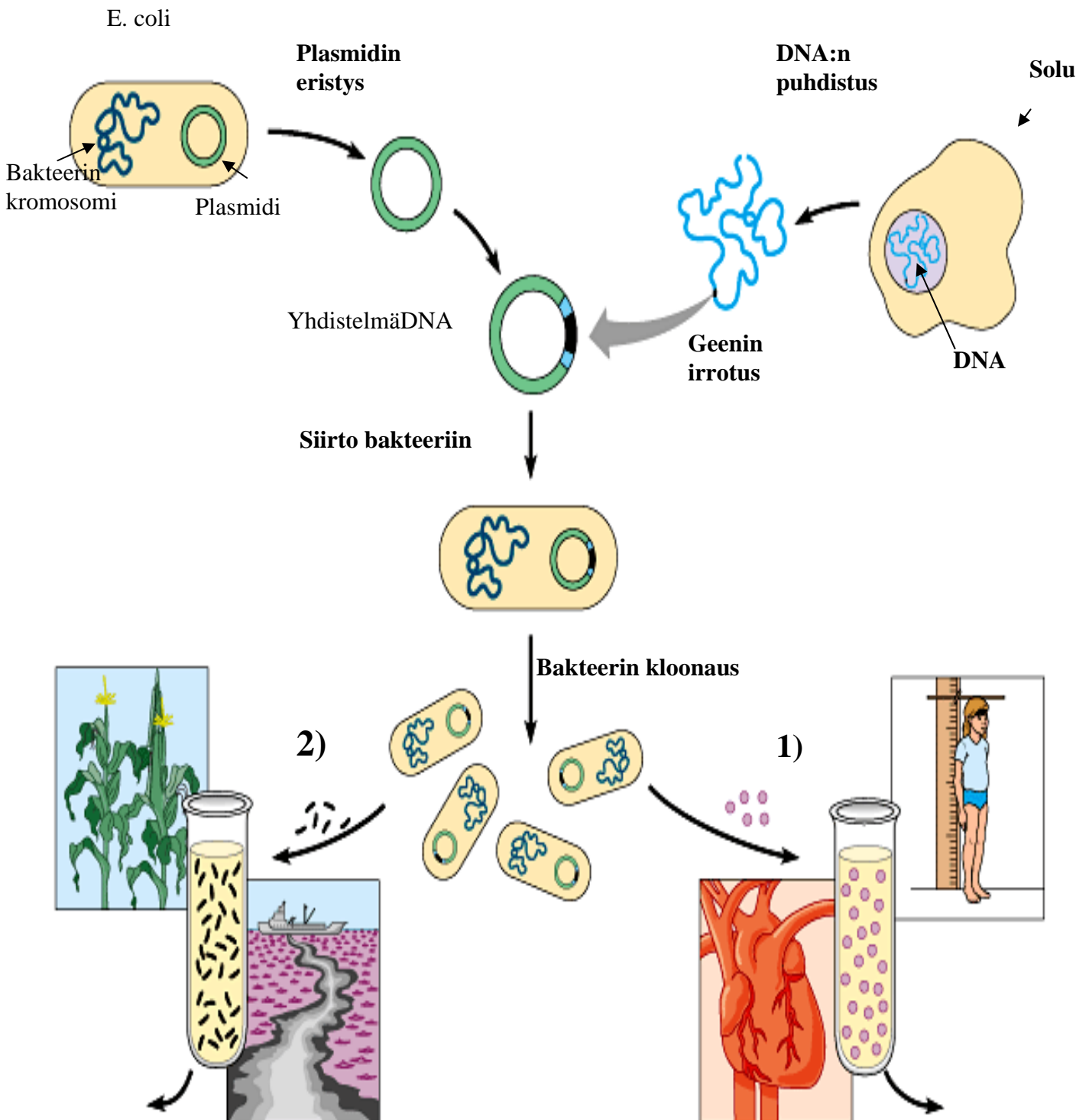
Geenin kloonauksen yleiset periaatteet

- * Vieras geeni siirretään bakteerin plasmidiin ja tämä yhdistelmä-DNA siirretään bakteeriin
- * Bakteerin jakautuessa myös yhdistelmäplasmidi jakautuu ja kopioituu jälkeläisiin
- * Suotuisissa olosuhteissa bakteeri saadaan tuottamaan vieraan geenin koodaamaa proteiinia

Ihmisen geenin kloonaminen bakteeriplasmidissa



Plasmidin käyttö biotekniikassa



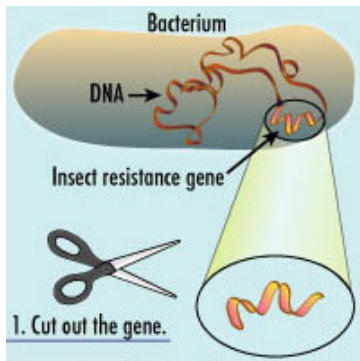
Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

2) Geeni voidaan eristää ja käyttää esim. tuottamaan bakteereita käytettäväksi öljyvaurioiden korjaamisessa tai antamaan kasville tuhohyönteissuojan

1) Bakteerin tuottama proteiini voidaan eristää, esim kasvuhormoni tai veren hyytymistekijä

Geenimuunnellun tomaatin tuottaminen

* hyönteisresistenssi



2. Insert gene into a vector with a selectable antibiotic resistance marker gene.

Antibiotic resistance gene



3. Copy vector in bacteria.



4. Coat tungsten or gold particles with DNA vectors.



5. Load vector-coated particles onto teflon bullet.



6. Load bullet into gene gun.



7. Shooting the gene gun releases the particles at a high velocity penetrating the plant cells.



8. The vector enters the cell. The genes are incorporated into the plant genome.



9. The cells are plated on a selective antibiotic media. Only cells that have incorporated the vector will grow.



10. These cells are transferred to medium containing plant growth factors.



Rekombinanttirokotteet, DNA - rokotteet

Rokotteet:

=> aktiivinen immuniteetti => muistisolut

=> passiivinen immuniteetti => vasta-aine taudin puhjettua
=> nopea vaste, lyhytaikainen, ei muistisoluja

DNA -tekniikalla:

* plasmidiin antigeenisen proteiinin geeni

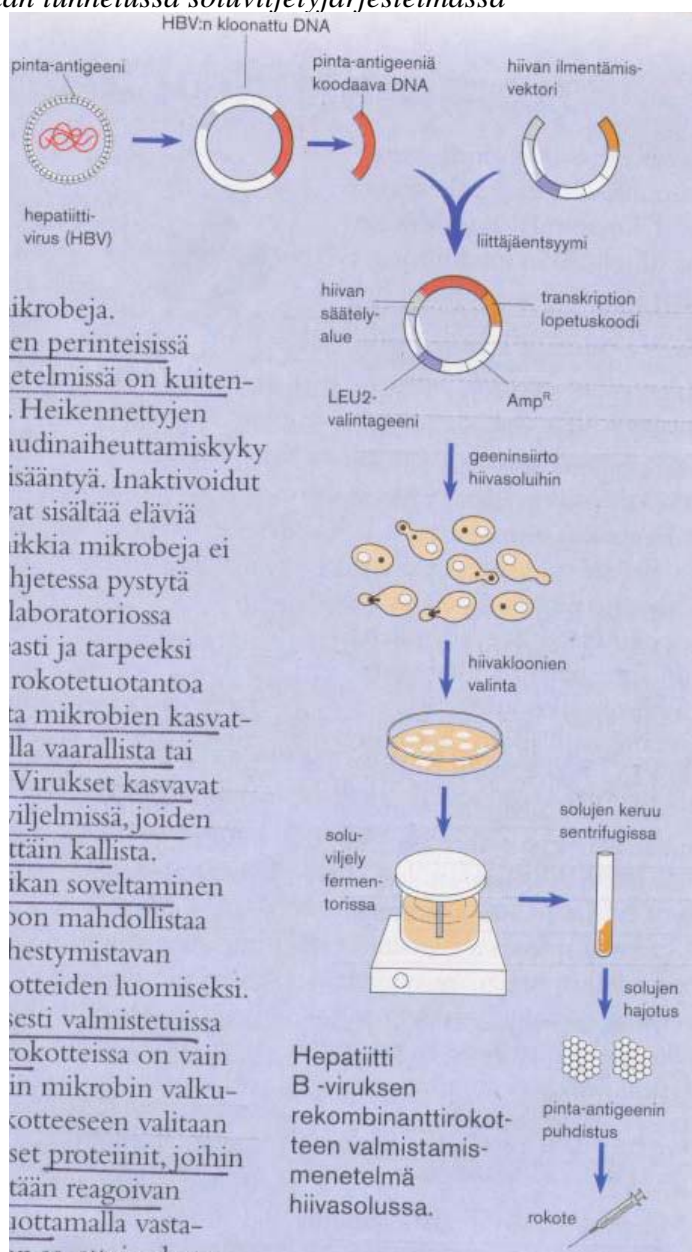
=> antigeenisen proteiinin tuotto => immunisointi

Hepatiitti B -viruksen rekombinanttirokotteen valmistaminen hiivasolussa

Hepatiitti B virus ei kasva missään tunnetussa soluviljelyjärjestelmässä

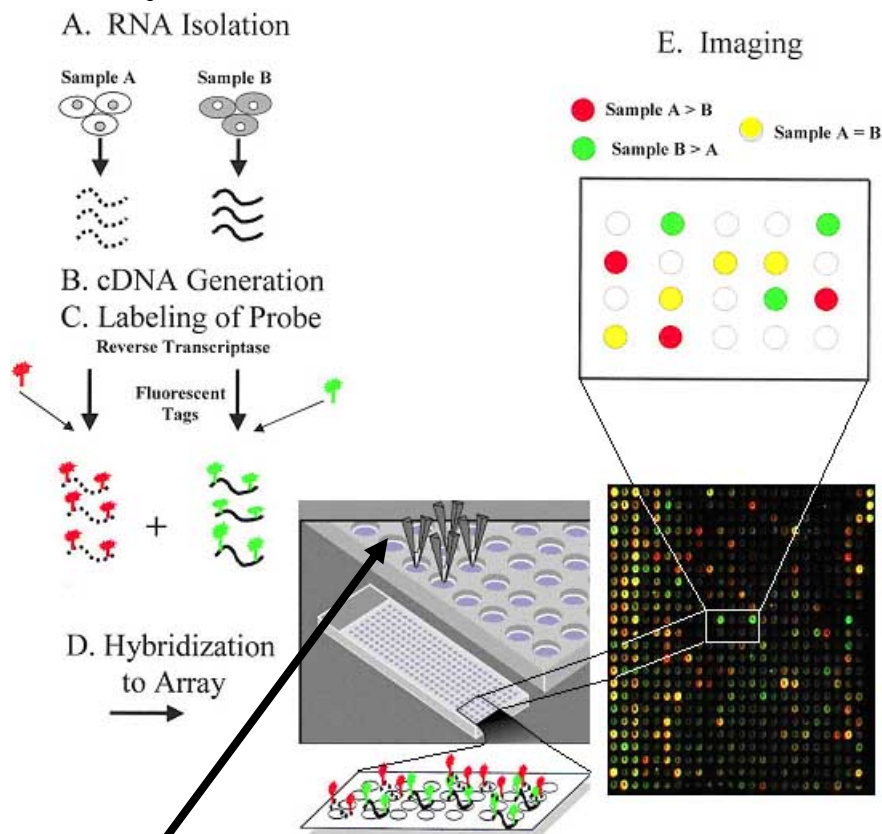
Etu: vain aktiivisin osa taudinaiheuttajasta => ei sivuvaikutuksia

Haitta: teho voi olla heikompi kuin perinteisillä



Geenien ilmentymisen / SNP:ien tutkiminen mikrosiruanalyysillä

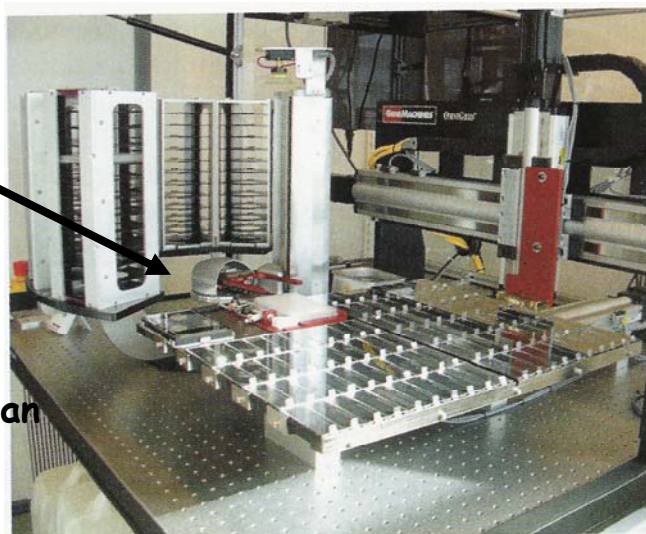
- * Tutkitaan yhtä aikaa suuren geenijoukon ilmentymistä ts. niiden IRNA:ta
- * Tutkitaan yhden emäksen muutoksesta aiheutuvia geenien rakenne-eroja /SNP (single nucleotide polymorphism)



- Mikrosirulle on koneellisesti applikoitu eri genejä vastaavia DNA -palasia, jotka tunnistavat näytteessä olevat, tutkittavan näytteen RNA:ta vastaavat cDNA:t

-Mikrosiru voidaan valmistaa tunnistamaan koko perimän geenit tai tietty geenijoukko (esim. syöpägeenit).

-"Suomi -siru" tunnistaa 30 tunnettua suomalaiseen tautiperimään kuuluvaa "tautiageeniä" 80 näytteestä



Mikrosirujen tekemiseen käytettävä robotti. Robotin hienonhieno neula ruiskuttaa lasilevyjen pinnalle yksijuosteista DNA:ta tuhansiksi pieniksi pisteiksi tiettyyn järjestykseen. Erilaisia mikrosiruja saa myös kaupallisilta valmistajilta.