

Geenitehnoloogia

Koostanud Ülle Irdt

Geenitehnoloogia

- =**insenergeneetika**:
DNA valitud lõikude eraldamine, töötlemine in vitro ja siirdamine kromosoomi, plasmiidi või viirusesse
- Eelduseks **rekombinantse DNA** loomine, so. DNA molekul, mis koosneb eri liigi DNA fragmentide ühendusest (1970)

Geenitehnoloogia

- **Restriktiivsed ensüümid** on bakterites leiduvad ensüümid, mis tagavad neile nn “immuunsuse” viiruste vastu lõigates nende DNA juppideks
 - Bakterid omavad võõra DNA vastu nn R/M süsteemi (restriktiivne modifikatsioon süsteem) toimub kahe ensüümi koostöö: restriktiivne enzüüm lõikab DNA fragmentideks ja metüültransferraas, mis metüleerib ära oma DNA ja kaitseb seega oma DNA-d lõhkumise eest.

Geenitehnoloogia

- Restriktiasad tunnevad ära teatud järjestusega nukleotiidi paarid (4-8) DNA-s
- Teada erinevaid restriktiase üle 3500:
 - I, III, IV tüüp lõikab DNA äratundmiskohast jupp maad eemalt
 - II tüüp äratundmiskohast või selle järgselt ja kleepuvalt
 - DNA lõikamine toimub kas kleepuvalt või tömbilt

Geenitehnoloogia

Kleepuvad otsad:

GAATTC
CTTAAG

Tömbid otsad:

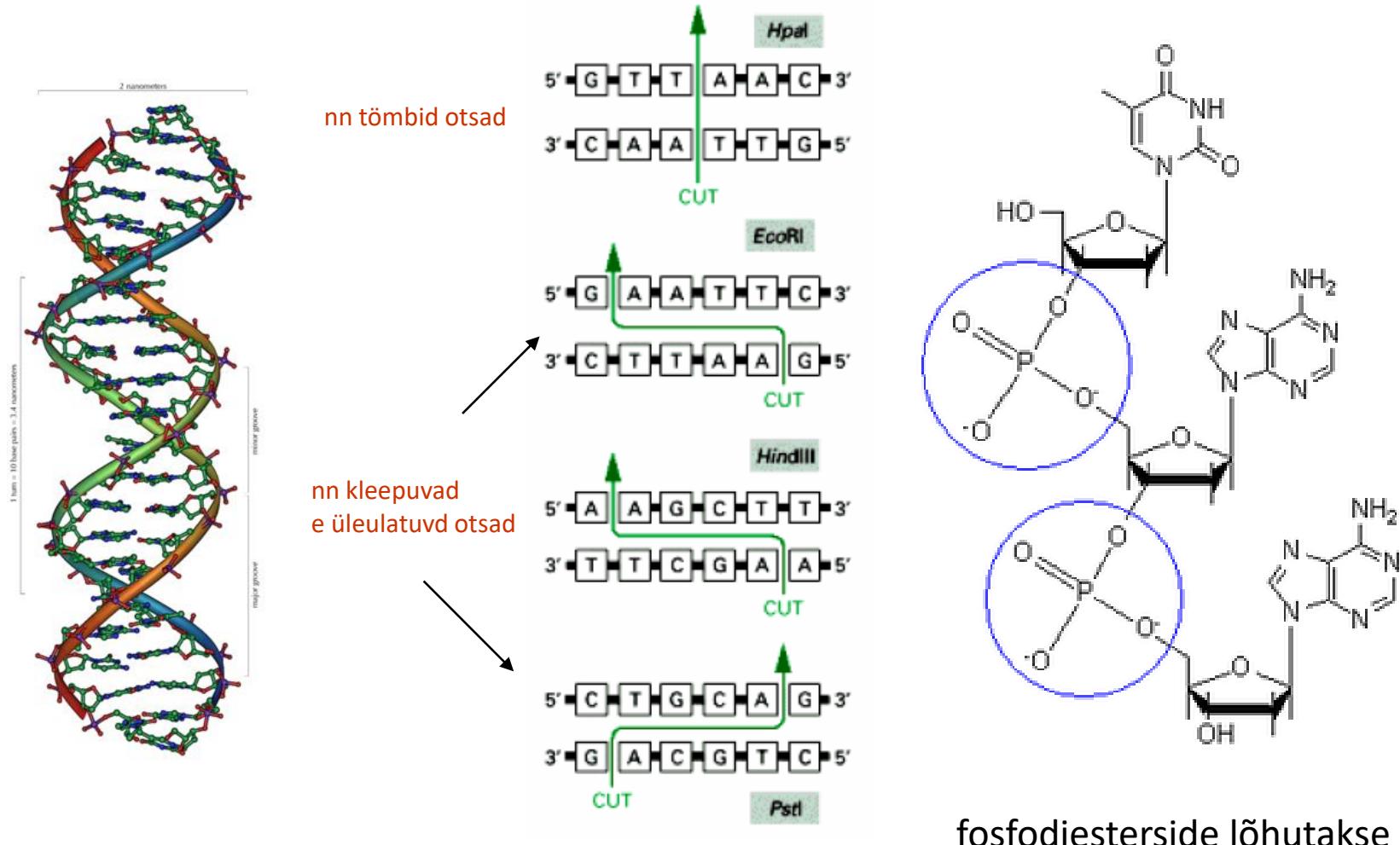
GAATT C
CTTAAG

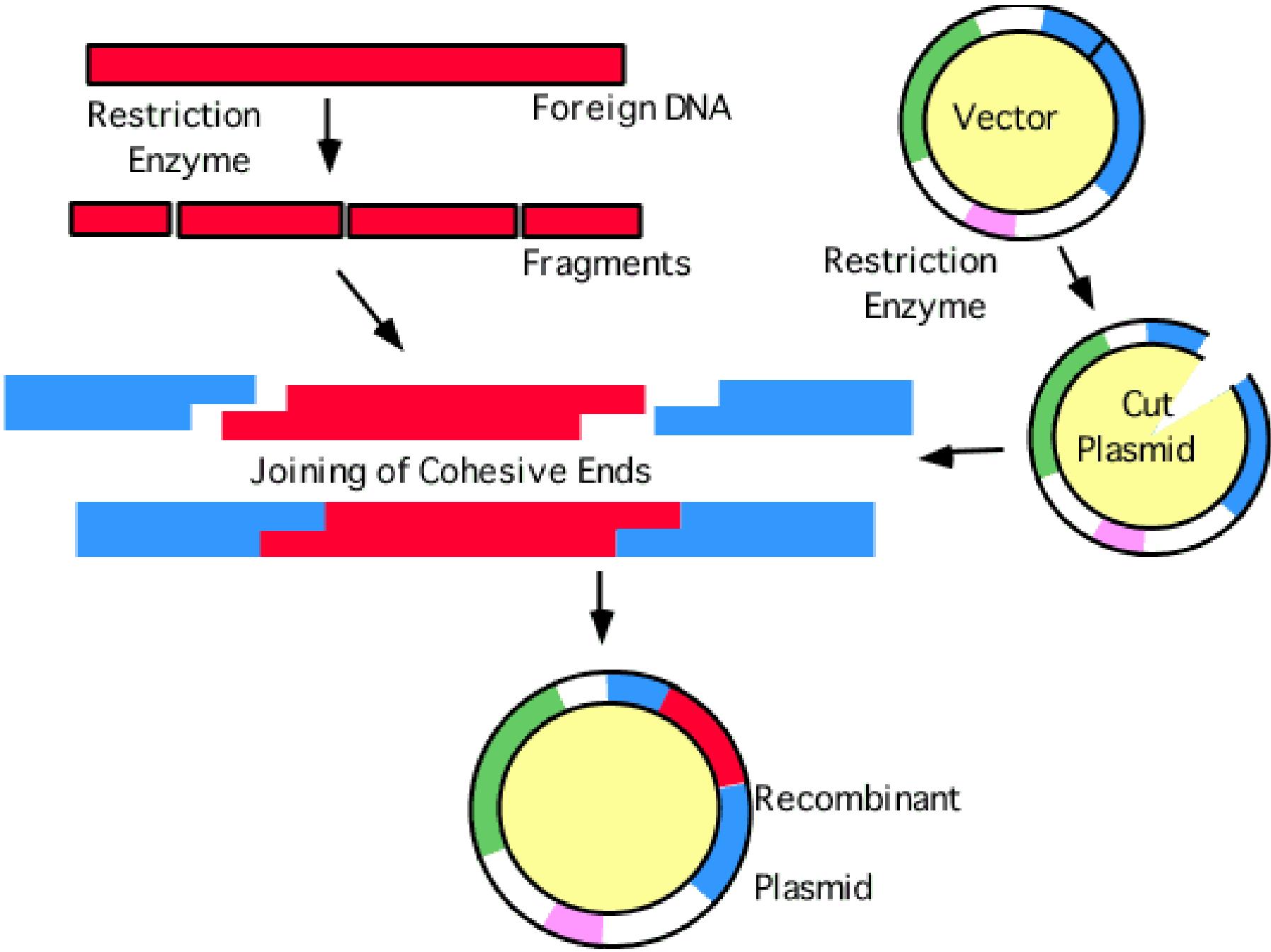
Erineva DNA sama järjestusega nukleotiigid liituvad komplementaarsuse alusel ja ahelate liitmiseks kasutatakse ensüümi **ligaas**

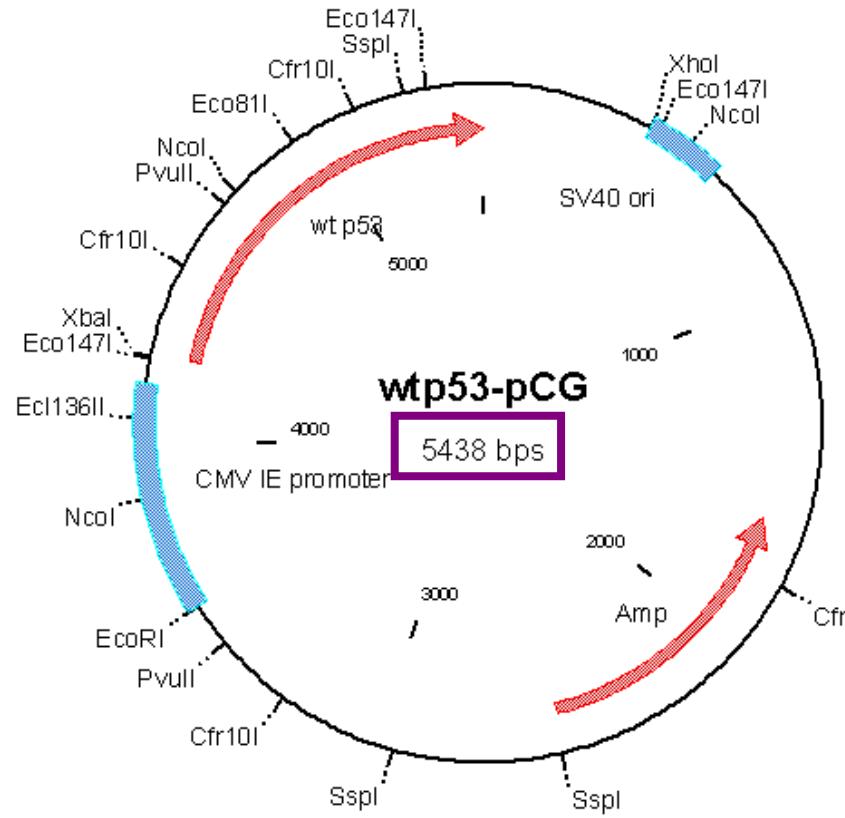
Restriktsooniensüümid

LÕIKAVAD SPETSIIFILIST KOHTA DNA-I

Koht, mille restriktsooniensüümid ära tunnevad, võib olla 4, 5, 6 või 8 nukleotiidi pikk. Mõnede ensüümide puhul on see koht ka pikem, mõnede puhul lühem.

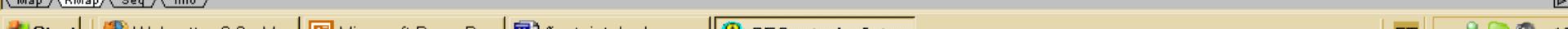








	#sites	-- Bp position of recognition site --																						
AatII	5	2634,	3650,	3703,	3786,	3972																		
AccI	1	5380																						
AciI	62																							
AflIII	3	370,	823,	4962																				
AhdI	1	1711																						
AluI	25	421,	448,	502,	764,	990,	1080,	1126,	1383,	1904,	2004,	2067,	2746,	2765,	2993,	3250,	3468,	4094,	4441,	4489,	4579,			
		4686,	5060,	5148,	5192,	5283																		
Alw44I	3	1137,	2383,	2880																				
AlwI	13	1390,	1464,	1476,	1561,	1574,	2038,	2341,	2359,	4171,	4186,	4274,	5248,	5438										
AlwNI	3	1234,	4455,	4972																				
ApoI	7	76,	105,	359,	2966,	2977,	3584,	4852																
AvaI	1	444																						
AvaII	4	1854,	2076,	4166,	4430																			
BanI	5	1664,	3201,	3994,	4715,	4906																		
BanII	4	3235,	4093,	4286,	5343																			
BbsI	3	4156,	4421,	5027																				
BbvCI	1	4826																						
BbvI	21	210,	647,	728,	746,	1165,	1230,	1233,	1439,	1767,	2133,	2744,	3343,	3415,	3488,	4460,	4487,	4569,	4684,	4779,	4791	5149		
BciVI	2	1032,	2559																					
BfaI	8	380,	464,	1318,	1571,	1906,	3315,	4251,	4278															
BglI	6	511,	1830,	3406,	3613,	3735,	3806																	
BlnI	1	463																						
BpmI	4	1801,	4121,	5032,	5350																			
Bpu1OI	1	4826																						
BsaAI	3	3162,	3867,	4627																				
BsaHI	7	2252,	2634,	3650,	3703,	3786,	3972,	4126																
BsaI	2	1783,	5094																					
BsaJI	20	463,	512,	521,	556,	983,	3515,	3889,	4181,	4392,	4426,	4470,	4564,	4731,	5087,	5155,	5156,	5251,	5295,	5313,	5331			
BsaWI	4	1029,	1176,	2007,	4995																			
BseRI	5	395,	482,	4259,	4824,	5194																		
BsgI	3	4479,	4509,	4682																				
BsiEI	5	736,	1160,	2083,	2232,	3437																		
BsiHKAI	7	1137,	2298,	2383,	2880,	4093,	5161,	5172																
BsII	19	200,	556,	665,	839,	857,	1023,	1302,	2750,	3054,	3380,	4174,	4366,	4518,	4706,	4726,	4922,	5082,	5219,	5313				
BsmAI	8	116,	1783,	2548,	2701,	2754,	3958,	4124,	5094															
BsmBI	3	2700,	2754,	4124																				
BsmFI	13	29,	425,	619,	3690,	3841,	4009,	4165,	4351,	4363,	4390,	4544,	4604,	5050										
BsmI	2	4449,	4597																					
Bsp1286I	11	1137,	2298,	2383,	2880,	3235,	4093,	4286,	4907,	5161,	5172,	5343												
BspHI	4	35,	1543,	2551,	2656																			
BspLU1II	3	370,	823,	4962																				
BspMI	1	4673																						
BsrBI	3	754,	2555,	3306																				
BsrDI	4	87,	1770,	1952,	4370																			
BsrI	19	413,	579,	1226,	1239,	1356,	1762,	1880,	1923,	2187,	2362,	3077,	3526,	3552,	3824,	4663,	5023,	5034,	5047,	5221				
BssKI	23	850,	971,	984,	1202,	1898,	2249,	2750,	2785,	3515,	3618,	3811,	4120,	4163,	4181,	4393,	4427,	4524,	4564,	4712,	5080		5156,	
BssSI	4	996,	2380,	2687,	5144																			
Bst4CI	17	785,	856,	1326,	1639,	2154,	2722,	2757,	3137,	3423,	3603,	3725,	3796,	4070,	4108,	4575,	4938,	4971						
BstAPI	2	190,	2882																					
BstF5I	14	351,	599,	1696,	1877,	2164,	2780,	3482,	4131,	4375,	4873,	4948,	5005,	5224,	5308									
BstUI	18	669,	671,	869,	1450,	1780,	2273,	2605,	2705,	2707,	2810,	2971,	3347,	3367,	3391,	3396,	4239,	4721,	4727					
Bsu36I	1	4922																						
Cac8I	17	206,	752,	838,	875,	1435,	1826,	2839,	3265,	3308,	3322,	3445,	3465,	3469,	3613,	3806,	4221,	5170						
Cfr10I	4	1796,	3265,	4498,	5097																			
Csp6I	10	2195,	2871,	3747,	3772,	3827,	3860,	3911,	4068,	4630,	4941													



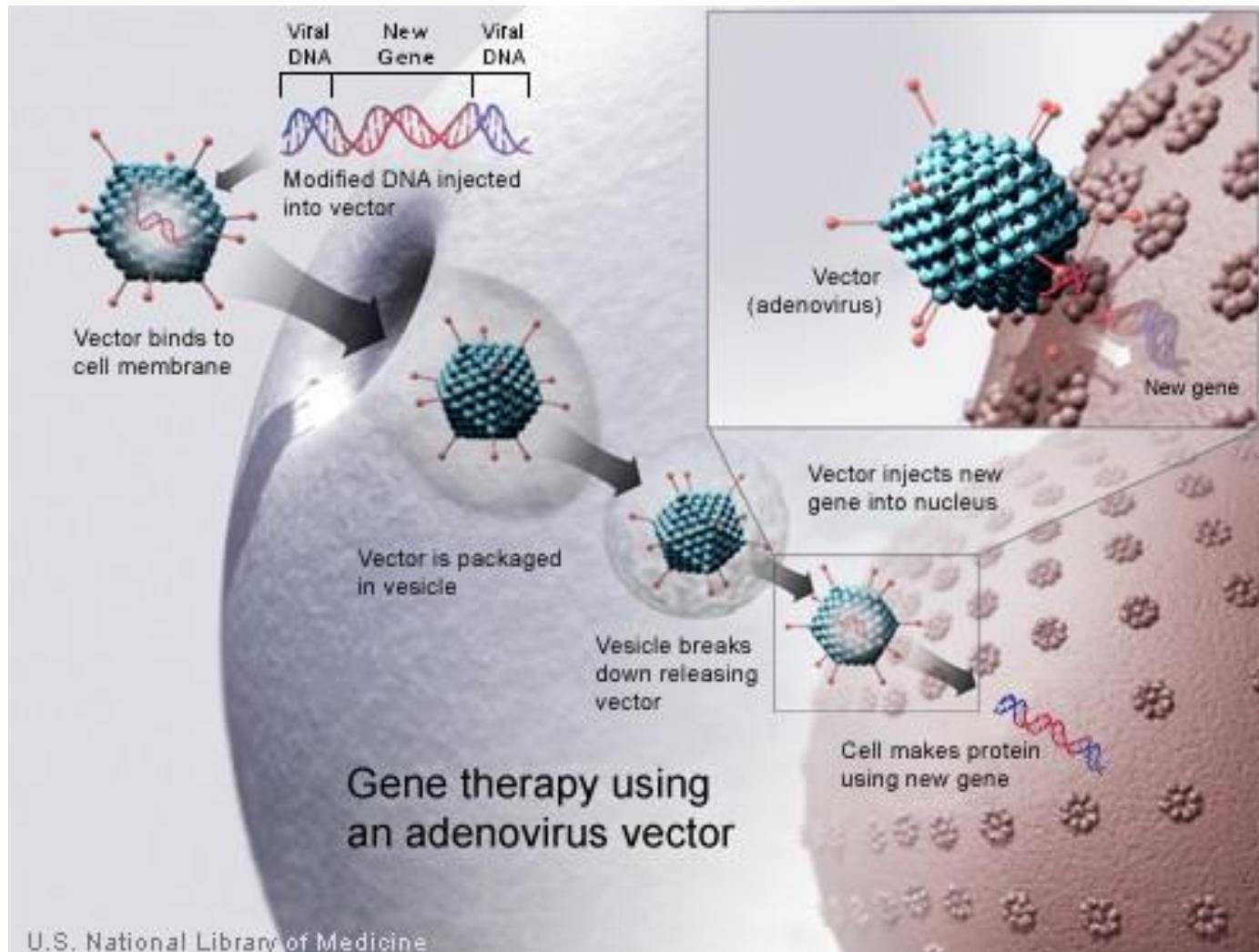
Geenide ülekanne

1. Bakteri plasmiidiga
2. Viirustega

Kui neile on soovitud geen lisatud, nimetame teda **geenivektoriks**.

3. Kullapüstoliga
4. Taimedesse Agrobakteriga

Viirusvektor viib soovitud geeni rakk



Kuidas kergesti aru saada, et soovitud geen on üle kandunud?

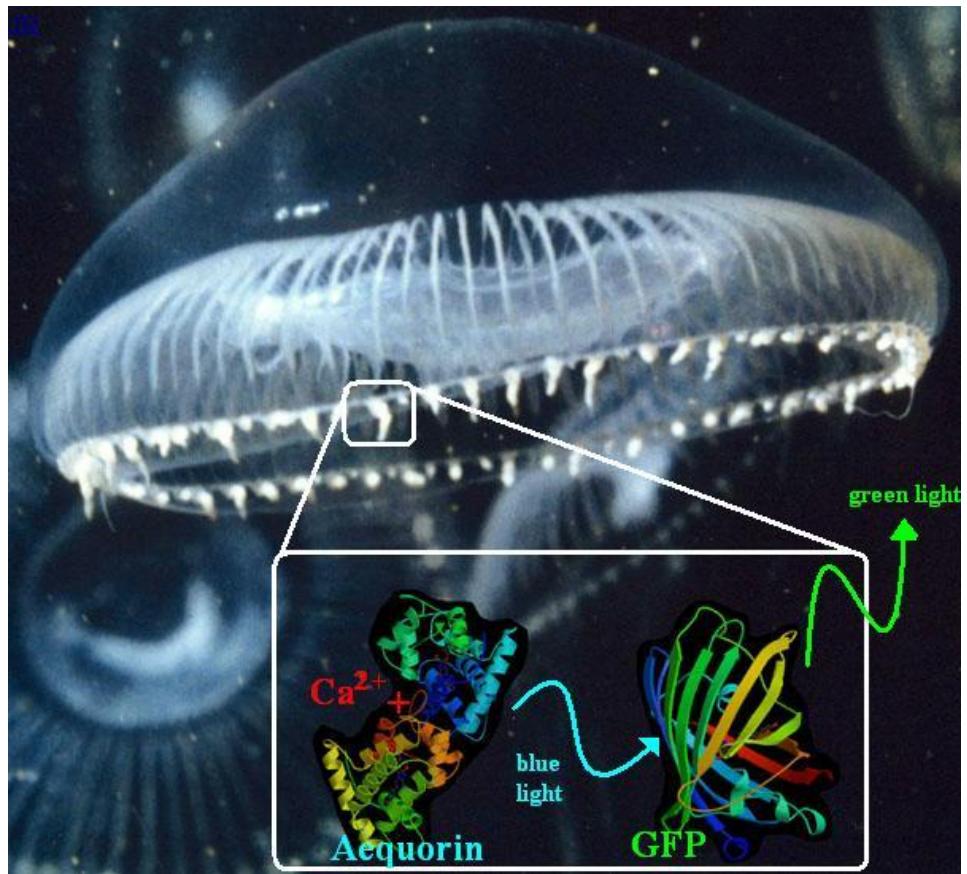
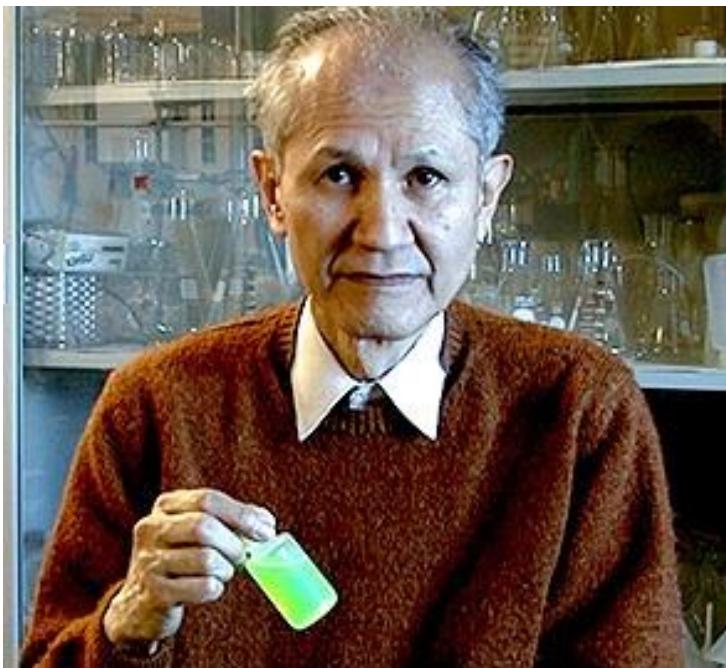
Üle viidavale geenile on marker geen külge pandud.

Näiteks kasutatakse GFP (helenduv) geeniga markerina:

Kui uuritava geeni lõppu, enne stopp-koodoneid, on sisestatud GFP geen, siis vastava valgu süntees ei peatu enne, kui ka GFP-valk on valmis.

Nii saab üle viidud geeni avaldumist organismis kindlaks teha: vaatad ja näed, et helendub!

Fluorestseeruv valk – GFP on saadud meduusist.



O.Shimura eraldas vastava geeni esimesena
Nobeli preemia 2008



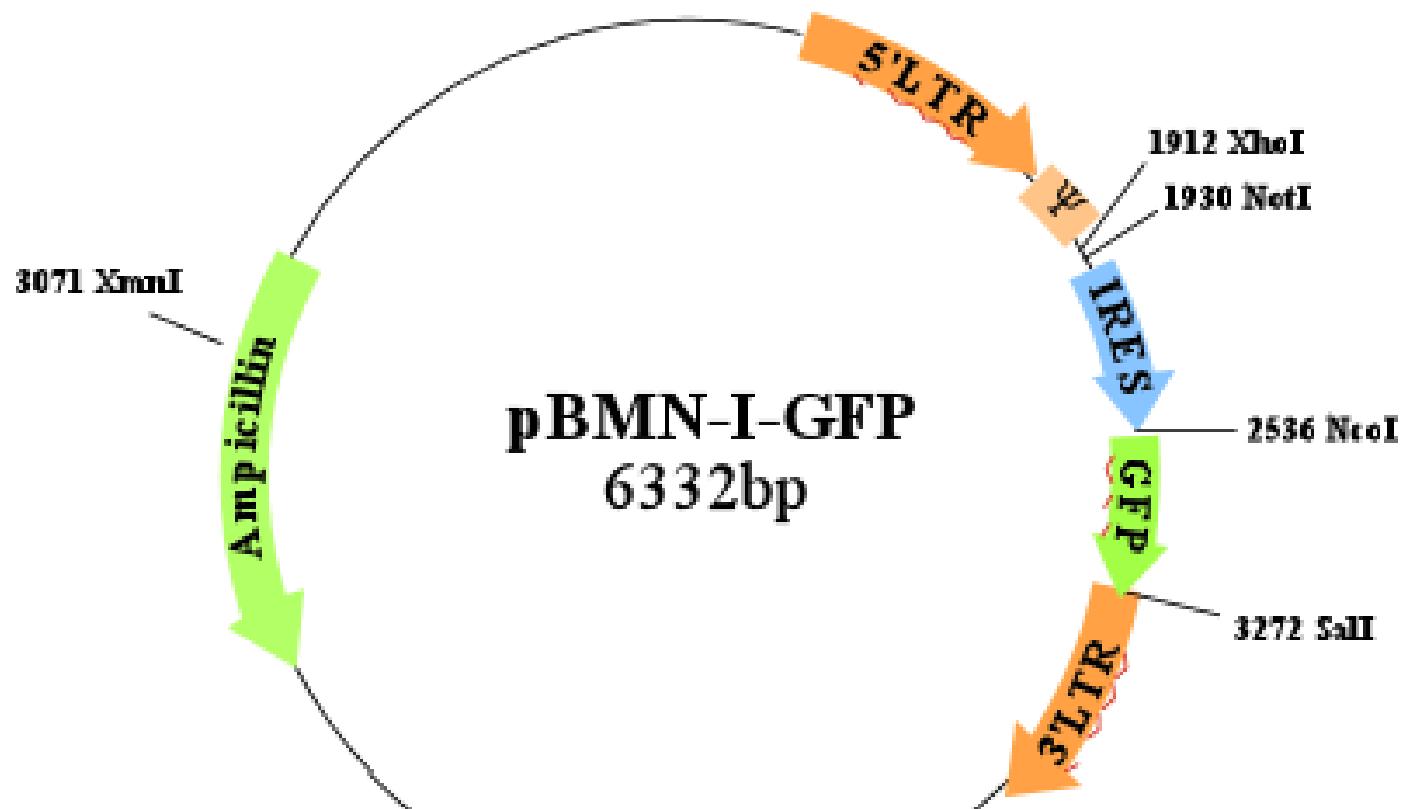
Helenduvad geenid on lisatud vaid markerina, et olla kindel geeni ülekandes.

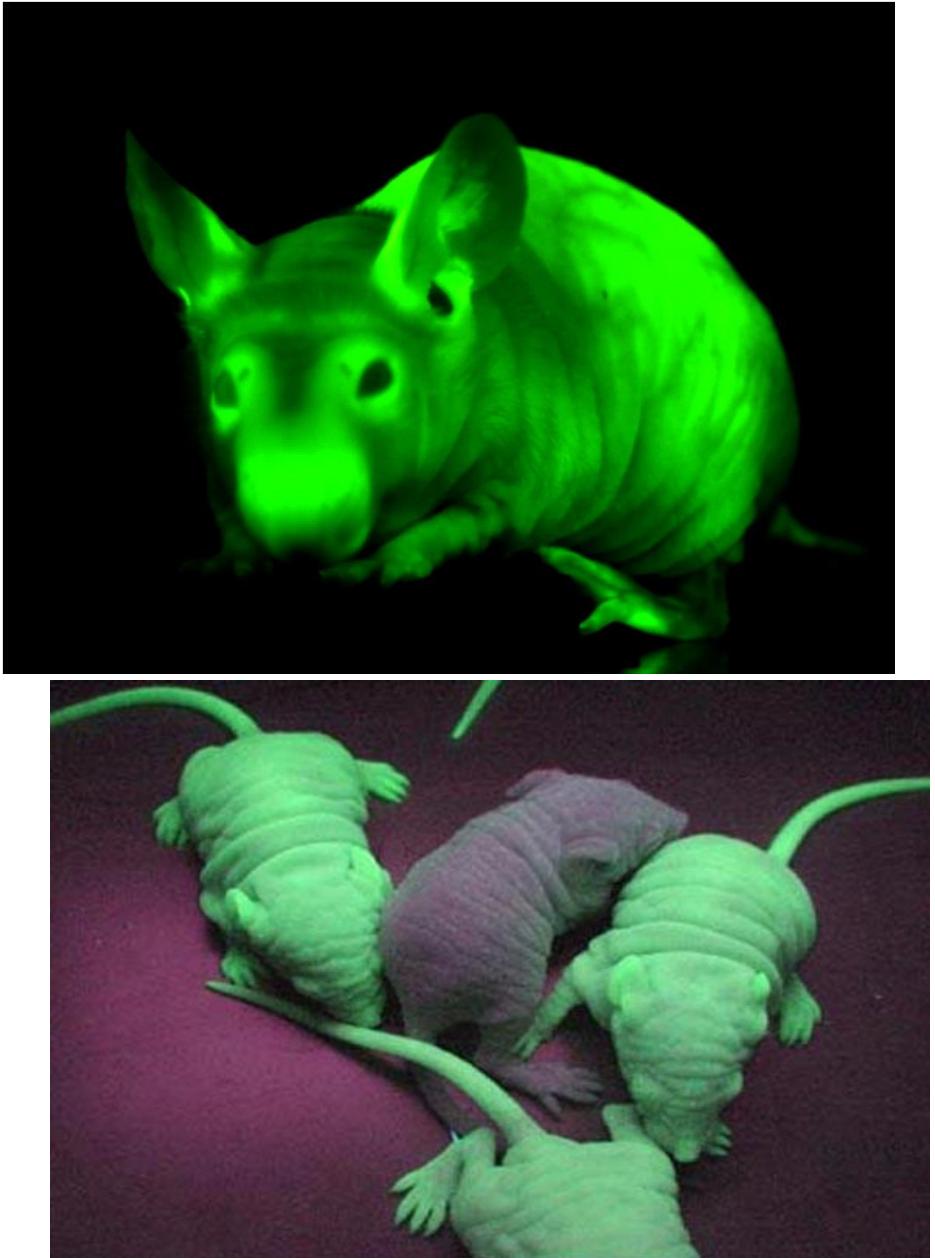
Albiino jänes hüppab ringi nagu iga tavaline jänsku, kuid pimedas toas UV-valgusel hakkab helendumma.



Helenduv kärss

Plasmiid, mis sisaldab GFP-geeni ja antibiootikumiresistentsust määrvat geeni





Inimese kasvajat põhjustavale geenile on lisatud GFP- geen. See on viidud hiire rakkudesse ning nüüd on võimalik jälgida kasvaja arengut, siirdeid jne.

Fig. 18. Dr Okabe's eGFP-expressing neonate mice look "green" all over their body when illuminated with an UV source (see: <http://kumikae01.gen-info.osaka-u.ac.jp/tg/tg-ad.cfm>).

Geenitehnoloogia

- GMO: geneetiliselt muundatud organism:
 - Transgeensed organismid
 - On sisse viidud teise liigi geene
 - Põhineb rekombinantse DNA tehnoloogial
 - Nokautorganismid
 - On nende enda geen välja lülitatud
(esimene USA-s müüki jõudnud GMO tomat-kauavalmivate viljadega)

Geenitehnoloogia

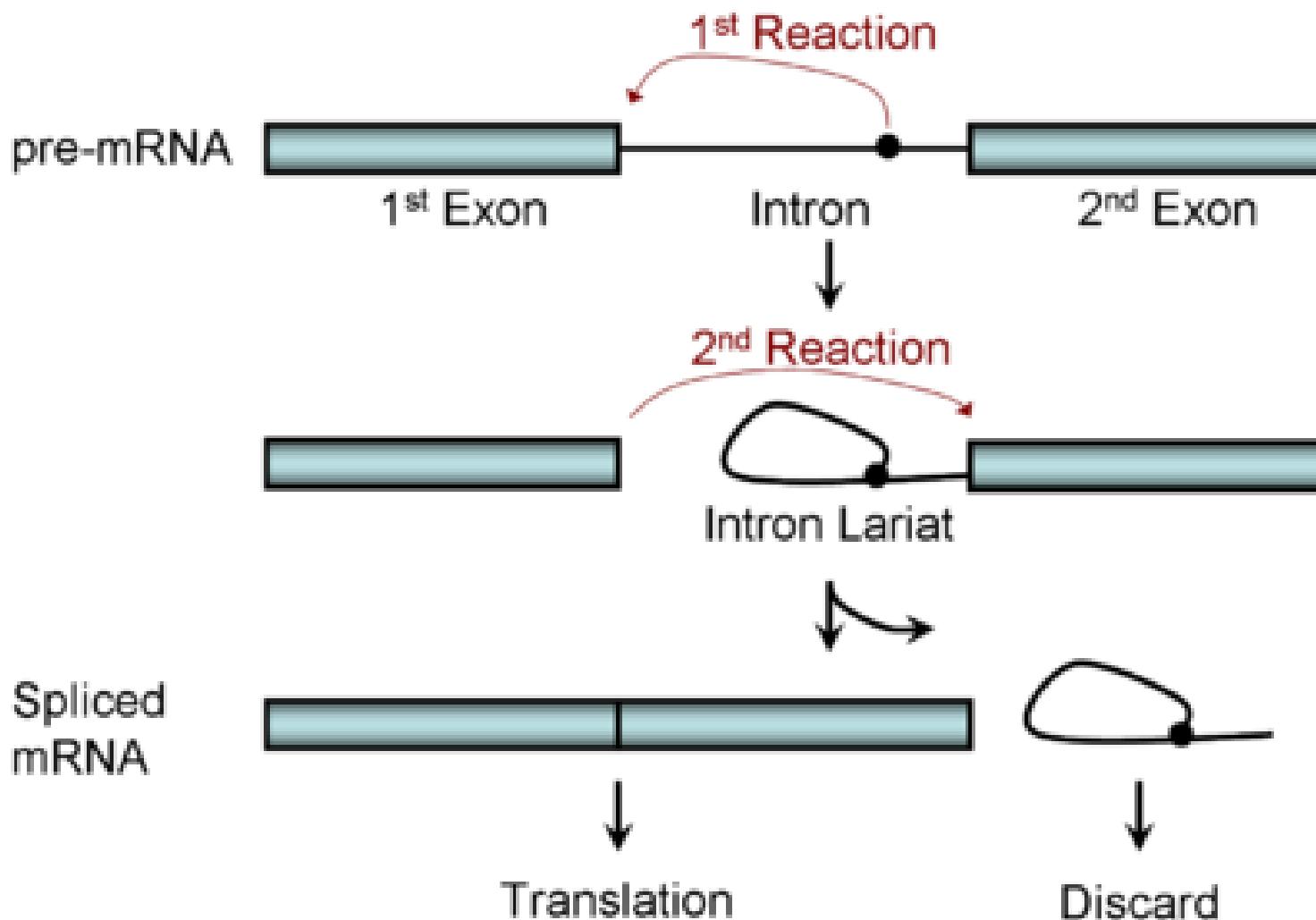
Meie ja teiste loomade, seente ja taimede geenis on **intronid ja eksonid**.

Pärast transkriptsiooni lõigatakse intronid välja ja ainult kokkuliidetud eksonid moodustavad mRNA, mille alusel sünteesitakse valk.

Bakter ei tunne ära introneid, vaid „loeb“ kõike!

Kui tahame bakterisse eukarüootse organismi geeni viia, siis peame selle mRNA alusel tegema DNA - retroviirustel olemas **pöördtranskriptaas (revertaas)**, mis selle töö ära teeb.

Nüüd teeb bakter sama valku, mis see geen inimese rakuski teeb.



- Esimene GM bakter loodi Kalifornias 1971. aastal
- 1973 – esimesed rekombinantsed viirused ja bakterid
- 70-ndate aastate teisel poolel hakati looma genoomipanku
- 1978 esimene inimese valku (insuliin) tootev bakteritüvi
- Esimesed GM taimed tehti Belgias ja Missouris 1983. aastal (tubakataimed).

Bakterid toodavad inimese valke alates
1978.aastast

Esimene oli **insuliin**.

Inimese kasvuhormoon

Erütropoietiin aneemia raviks

Interferoon, mis reguleerib immuunsüsteemi

Vere hüübimisfaktorid

Difteeria ja teetanuse vaktsiin

Pärmseened teevad B-hepatiidi vaktsiini

Putukarakud toodavad papilloomi vaktsiini

Transgeensed loomad

- Esimene transgeenne hiir saadi 1981.a.: roti kasvuhormooniga kasvas 2 X suuremaks.
- Miks hiiri kasutatakse kõige rohkem?
 - On imetaja
 - Paljuneb kiiresti – tulemused ilmnevad kiiresti
- 2013 a kevadel/suvel tulid Tartus veterinaaria instituudis ilmale 2 transgeenset lehmvasikat, kes pidid kasvuhormooni oma piimas hakkama tootma

Transgeensed loomad

- Geenivektoritena kasutatakse viirusi või vääriakse vajalik geen otse mikropipetiga hiire viljastatud munarakku
 - Munaraku viljastamine in vitro
 - Geeni siirdamine mikropipetiga
 - Embrüo siirdamine asendusemasse
 - Tiinus, järglase sünd = transgeensed isendid ja kandub edasi ka nende järglastele!

Näited ravimeid tootvatest loomadest

- GM-kitse piimas antikehad kasvajate vastu
- GM-lehma piimas laktoalbumiin enneaegsetele lastele
- GM-sead toodavad inimese hemoglobiin



Geenitehnoloogia loomade tõuaretuses

- Sigade ja lammaste kaal kasvas 30%
- Kalkunite munevus suurenes
- Lihaloomad, kelle tailiha ja rasva osakaal on täpselt määratud
- Forell jt kalad kasvasid 2 korda suuremaks
- Eestis toodetakse TÜMRI laborites transgeenseid hiiri ja müükse neid maailma teadusasutustesse katseteks.

Geenitehnoloogia loomade tõuaretuses

- 2013. mais sündis Põllumajandusakadeemias transgeenne vasikas Mai, kes suri varsti, juunis sündis teine transgeenne kloonvasikas Juuni, kes elas peaaegu kolmkuuseks, kuid suri. Neile oli sisse viidu inimese kasvuhormooni tootev geen, mida oleks inimesed saanud nende toodetud piimaga omandada. (Sulev Kõks ja Ülle Jaakmaa). Tekkis hingamispüudulikkus, mis transgeensetele imetajatele väga omane.
- 2014.sept./okt. sündis vasikas, kellele sooviti lisada kasvuhormooni määrvat geenit. Praegu (2018.a.) kloonloom elus, kuid selgus, et geenit sisseviimine ebaõnnestus, seega kasvuhormooni ei tooda.

Geenitehnoloogia loomade tõuaretuses

- Kloonloomade probleemid:
 - ülekaalulitus, vajadus geisrilõike järele;
 - hingamisprobleemid, sest kopsud ei taha töötada;
 - jalgade nõrkus, eriti tagajalgade nõrk kandvus;
 - suurloomade puhul liigsöömisest ja vähesest liikumisest tekkivad koolikud ja soolekeerdumised.
- See kõik suurendab nende suremust. Lisaks küsimus, kuidas neid hormoone, aineid eraldada, müüa?

Transgeensed loomad

- Transgeensete suurimetajate saamine on keerukas:
 - munaraku kahjustamine, tänapäeval viiakse üha enam geen in vitro embrüonaalsesse tüvirakku. Need omakorda uude varajasse embrüosse
 - embrüosiirdamine ei ole sageli edukas jne.
 - Ei oleolemas geenivektorit, mis integreeriks alati vajalikus kohas (kahjustab olemasolevaid geene)
 - Siiratav geen vajab veel koespetsiifilist promootorit, et hakkaks tööle õiges kohas ja ajas
 - Väga suur katsete arv! (200-300 katset, see võib mõjutada katsealuse elukvaliteeti!)

Jõulusea geneetiliselt muundatud sööt tuleb Paraguayst

Lõuna-Ameerika riigid Argentina, Brasilia ja Paraguay on maailmas USA järel suurimad geneetiliselt muundatud taimede kasvatajad.

Sigade, lindude ja lehmade jõusööt – sojasrott.

Sojasrotiga toidetud tööstuslikult kasvatatud loomad võrsuvad kiiremini. 2 kg broileri kasvatamiseks kulub sojasöödaga kasvatades 40 päeva. GM-soja tuleb enamikus Ameerikast.

70%

maailma sojasaagist on geneetiliselt muundatud.

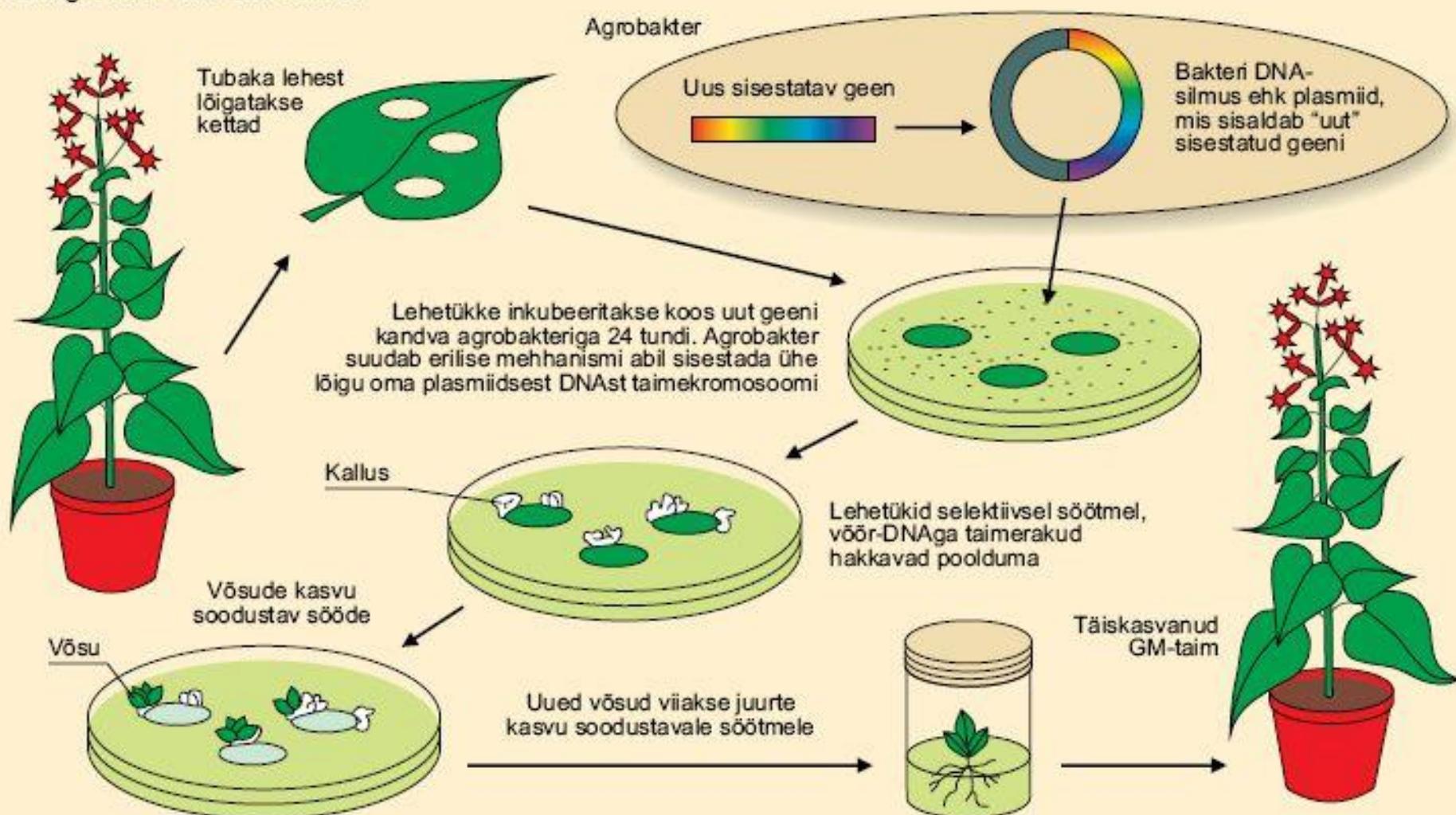


allikas: Creditlynx, Author: Rami

http://www.eko.org.ee/gmo/index.php?option=com_content&task=view&id=31&Itemid=42

GM-taime valmistamine

Et eraldada DNA-ahelast siirdamiseks vajalikke geene, kasutatakse restriktiooniensüüme, mis lõikavad DNA-ahela soovitud kohast lahti ja valivad vajalikud geenid. Need DNA-lõigud viiakse bakteri DNAsse – plasmiidi. Bakter paljuneb kiiresti ja lühikesse aja jooksul valmistatakse tuhandeid "uue" geeni koopiaid. Plasmiidis sisalduv DNA-lõik koos "uue" geeniga kantakse agrobakteri vahendusel taimerakkudesse, mis võimaldab saada transgeense ehk GM-taime.



Kasutatud kirjandus

- <http://www.bioneer.ee/eluviis/tarbimine/aid-4067/Mis-on-GMO->
- <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f2/GloFish.jpg/220px-GloFish.jpg>
- <http://f3.pmo.ee/f/2009/12/14/282651t41h420e.jpg>
- http://www.eko.org.ee/gmo/index.php?option=com_content&task=view&id=31&Itemid=42
- Suulised andmed Maaülikoolist (Ülle Jaakma, Elina Mark)
- Viikmaa, M.; Tartes, U. ((2008): Bioloogia Gümnaasiumile II, 3. kursus. Eesti Loodusfoto
- Tenson, T., Kaldalu, N.; Tehnunen, A. (2013): Bioloogia Gümnaasiumile 3., Avita