

Molekulární biotechnologie č.10

Využití poznatků molekulární biotechnologie. Mikrobiální insekticidy.

Využití molekulární biotechnologie – v mnoha oblastech

- Molekulární diagnostika
- Bioremediace a využití biomasy
- Využití škrobu a sacharidů, utilizace celulózy
- Mikrobiální insekticidy
- Baktérie stimulující růst rostlin
- Vakcíny a terapeutické proteiny.
- Příprava a využití transgenních rostlin. Nové potraviny.
- Příprava a využití transgenních zvířat.
- Genová terapie lidských somatických buněk.

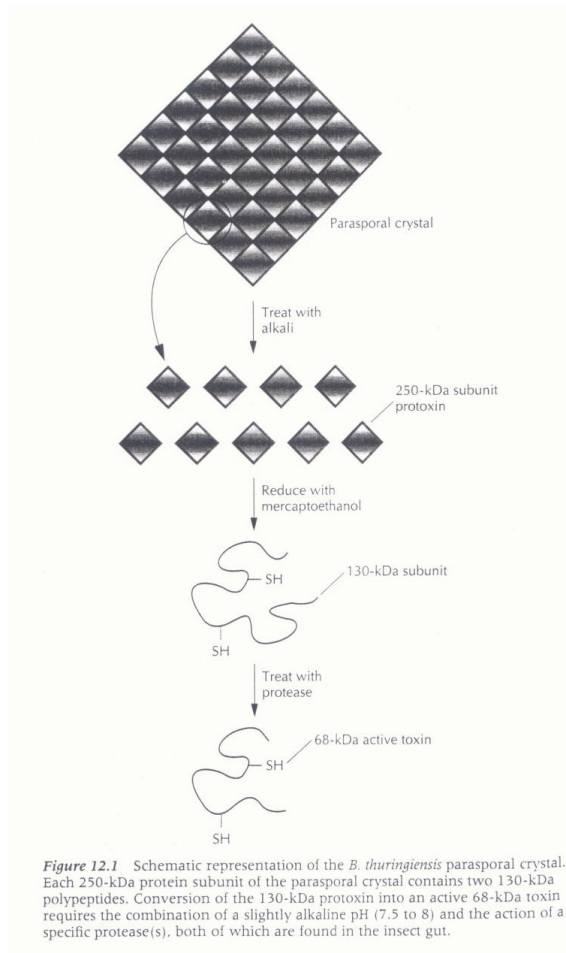
Mikrobiální insekticidy (přípravky k hubení hmyzu)

- V budoucnu pravděpodobně nahradí chemické pesticidy (chemický prostředek sloužící v zemědělství k hubení nežádoucích rostlinných nebo živočišných organismů)
- Jsou produkovány baktériemi druhu *Bacillus thuringiensis*

Přeměna protoxinu na toxin

- Baktérie druhu *Bacillus thuringiensis*
- Produkují protoxin ve formě parasporálního krystalu
- V zažívacím traktu housenek dochází k přeměně protoxinu na toxin – díky alkalickému prostředí a přítomnosti specifických proteáz a střevní mikroflory

Parasporální krystal



Mechanismus účinku aktivního toxinu *Bacillus thuringiensis*

- Toxin se váže na střevní epitelové buňky housenek
- V epitelu vznikají membránové kanálky, kterými uniká ATP.
- To vede k hladovění, snížení buněčného metabolismu, dehydrataci a smrti hmyzu

Membránové kanálky (Glick a spol. 2003)

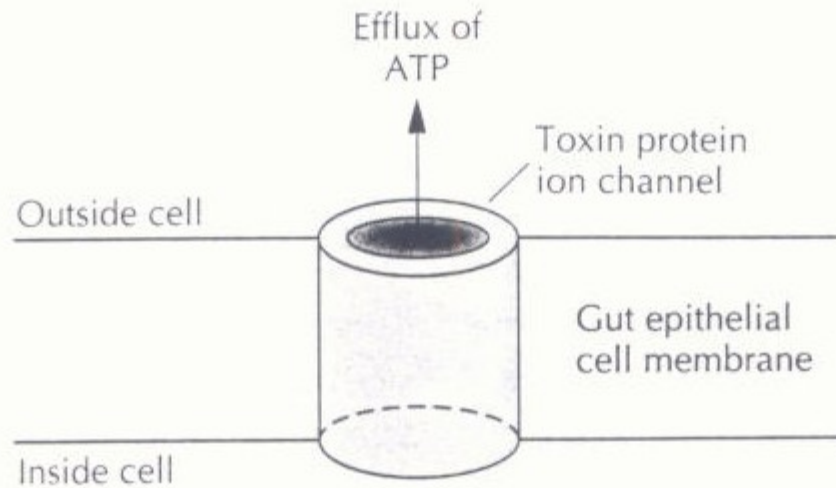


Figure 12.2 Insertion of the *B. thuringiensis* toxin into the membrane of an insect gut epithelial cell. The toxin forms an ion channel between the cell cytoplasm and the external environment.

Toxiny různých kmenů *Bacillus thuringiensis*

- Jsou vysoce specifické pro určitý druh hmyzu (hmyzích škůdců)
- Jsou biodegradabilní a proto jejich používání nevede ke vzniku resistance

Byly charakterizovány a klónovány geny

- Různých kmenů kódující různé toxiny
- Geny bývají lokalizovány na plasmidech

Izolace různě velkých plasmidů, z nichž některý nese protoxinový gen

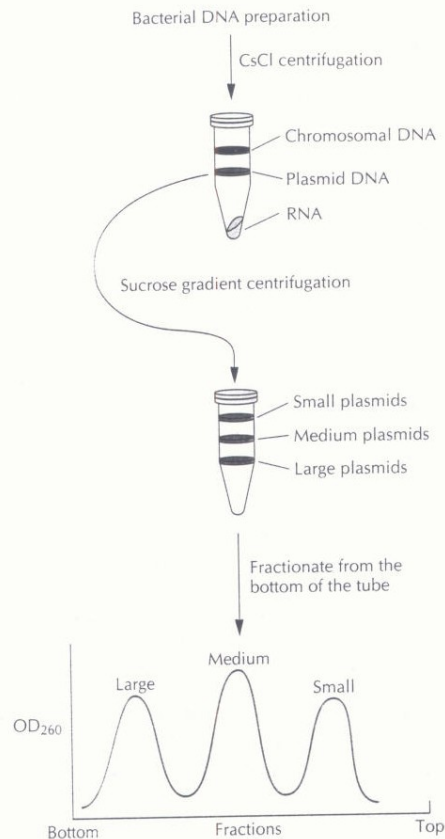


Figure 12.3 Procedure for the isolation and partial enrichment of plasmid DNA fractions from a microorganism with a number of different plasmids, one of which encodes an insecticidal protoxin.

Vyhledání plasmidu s protoxinovým genem

- Lze provést pomocí DNA/DNA hybridizace
- DNA sonda se připraví ze známého protoxinového genu

Genetické inženýrství kmenů *Bacillus thuringiensis*

- S cílem rozšířit specificitu účinku toxinu na další druhy škodlivého hmyzu a
- Zkonstruovat bakteriální kmeny nesoucí více genů toxicity
- Příp. docílit konstitutivní exprese

Rozšíření toxicity kmenů *B.thuringiensis*

Table 12.1 Toxicity of naturally-occurring and transformed strains of *B. thuringiensis* against the insects *Pieris brassicae* (cabbage white butterfly), *Aedes aegypti* (mosquito), and *Phaedon cochleariae* (beetle).^a

Source of toxin		Toxicity to <i>Pieris</i>	Toxicity to <i>Aedes</i>	Toxicity to <i>Phaedon</i>
Host DNA	Introduced DNA			
<i>aizawai</i>	None	++	+	-
<i>israelensis</i>	None	-	++	-
<i>israelensis</i>	<i>aizawai</i>	++	++	-
<i>israelensis</i>	<i>tenebrionis</i>	+	++	-
<i>kurstaki</i>	None	++	+	++
<i>kurstaki</i>	<i>tenebrionis</i>	++	+	-
<i>tenbrionis</i>	None	-	-	++
<i>tenbrionis</i>	<i>aizawai</i>	++	+	+

^a In these experiments, the toxicity was graded as follows: ++, 0 to 5% of the leaf was consumed (for *Phaedon* and *Pieris*) or 100% mortality occurred within 1 hour (*Aedes*); +, 5 to 50% of the leaf was consumed (*Phaedon* and *Pieris*) or 50 to 100% mortality occurred within 24 hours (*Aedes*); -, >50% of the leaf was consumed (*Phaedon* and *Pieris*) or no mortality occurred within 24 hours (*Aedes*). The test plant was either cabbage leaf (for *Pieris*) or turnip leaf (for *Phaedon*).

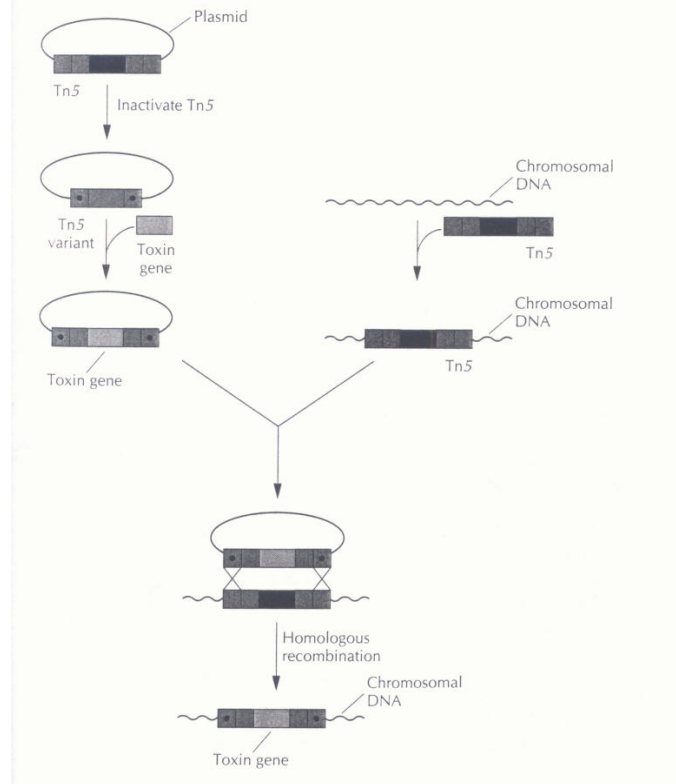
Adapted from Crickmore et al. 1990. *Biochem. J.* **270**:133-136.

Specifické geny kódující mikrobiální toxiny

- Byly klonovány do sinic (slouží jako zdroj potravy komárům) a to umožnilo ničit komáry
- Byly klonovány do půdní bakterie *Pseudomonas fluorescens* a to vedlo ke zlepšení růstu hospodářských plodin – byl eliminován nežádoucí účinek hmyzích škůdců

Genově modifikovaná *Pseudomonas fluorescens*

Figure 12.5 Procedure for the development of a genetically engineered *P. fluorescens* that carries a copy of the *B. thuringiensis* insecticidal toxin gene integrated into its chromosomal DNA. The *B. thuringiensis* insecticidal toxin gene is cloned into an excision-defective variant of Tn5 on a plasmid. This construct is introduced into a *P. fluorescens* strain containing a wild-type Tn5 sequence that was integrated into its chromosomal DNA. By homologous recombination, the excision-defective Tn5 element carrying the *B. thuringiensis* insecticidal toxin gene becomes integrated into the *P. fluorescens* chromosome.



Subklonování protoxinového genu

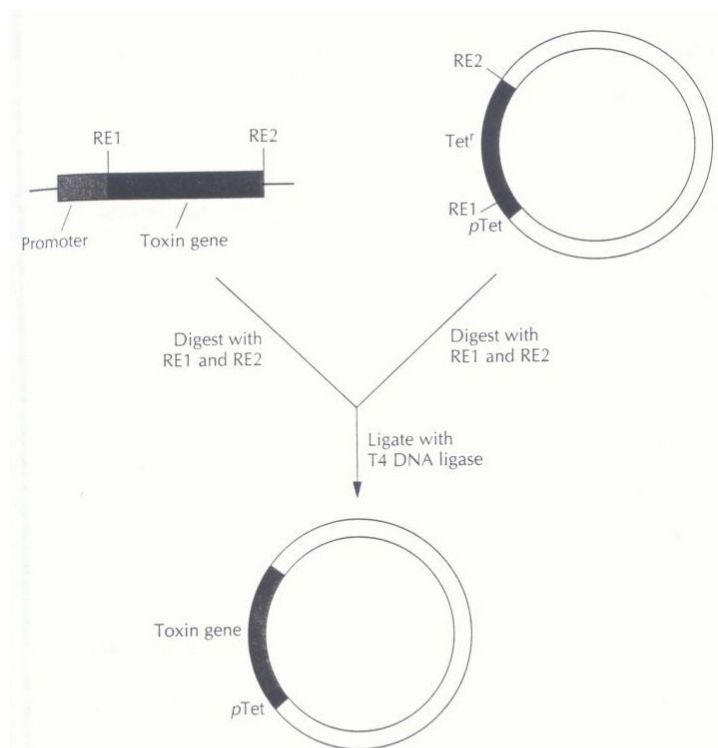


Figure 12.4 Procedure for subcloning the *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* insecticidal toxin gene so that it is expressed constitutively under the control of the promoter of the tetracycline-resistance gene (*pTet*). The isolated *B. thuringiensis* toxin gene is removed from its promoter by digestion of the isolated DNA fragment with restriction enzymes RE1 and RE2. It is spliced, by T4 DNA ligase, into the plasmid vector downstream from *pTet* in place of the tetracycline-resistance gene, which had been removed by digestion with restriction enzymes RE1 and RE2.

