

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty		Laitos — Institution — Department	
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Biotieteiden laitos, Perinnöllisyystieteen osasto	
Tekijä — Författare — Author Anne Kanerva			
Työn nimi — Arbetets titel — Title <i>Bacillus thuringiensis</i> en <i>cryIA(a)</i> ja <i>cryIG</i> -geenien muokkaus kasvitransformaatiota varten, ilmentäminen <i>Escherichia colissa</i> ja torjuntavaikutusten määrittäminen hyönteisbiotestein			
Oppiaine — Läroämne — Subject Perinnöllisyystiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Pro Gradu-tutkielma		Aika — Datum — Month and year Maaliskuu 1997	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 92
Tiivistelmä — Referat — Abstract			
<p><i>Bacillus thuringiensis</i> on gram-positiivinen maaperäbakteeri, joka itiönmuodostusvaiheensa aikana tuottaa biologisena torjunta-aineena käytettyjä delta-endotoksiineja. Toksiinien kohdehyönteisspesifiteetti on korkea kohdistuen tarkasti tiettyyn hyönteislahkoon. Spesifiteetti perustuu toksiinin vaikutusmekanismiin, johon kuuluvat aktivaatio hyönteisen ruoansulatuskanavassa, aktivoituneen toksiinin sitoutuminen hyönteisen ruoansulatuskanavan epiteelisolun solukalvon reseptoriin ja ionikanavan muodostumisen solukalvolle. Solun osmoottinen tasapaino häiriytyy ja hyönteisen ruoansulatus toiminnat pysähtyvät.</p> <p>Toksiinien synteesi on seurausta <i>B. thuringiensis</i>en <i>cry</i>-geenien ilmenemisestä. <i>Cry</i>-geenit muodostavat laajan geeniperheen, joka on jaettu viiteen alaluokkaan, <i>cryI</i> (<i>lepidoptera</i>-spesifiset), <i>cryII</i> (<i>lepidoptera</i>- ja <i>diptera</i>-spesifiset), <i>cryIII</i> (<i>coleoptera</i>-spesifiset) <i>cryIV</i> (<i>diptera</i>-spesifiset) ja <i>cryV</i> (<i>lepidoptera</i>- ja <i>coleoptera</i>-spesifiset toksiinit). Bioteknologian kehittyminen on mahdollistanut näiden geenien kloonauksen ja siirtämisen viljelykasveihin. Näin pyritään kehittämään hyönteiskestävyttä hyötykasvilajikkeissa.</p> <p>Tässä työssä käytetyt <i>cry</i>-geenit lyhennettiin PCR-menetelmällä käyttäen vastaamaan delta-endotoksiinimolekyylin aktiivisen ydinpartikkelin kattavan osan synteesistä. Niistä valmistettiin kasvissa ilmentämistä varten fuusiot GUS-merkkigeenin kanssa. Valmiit geenikonstruktiot liitettiin tandemduplikoituun CaMV35S::35S-promootoriin ja siirrettiin co-integratiiviseen kasvitransformaatiovektoriin pHTT294. Näin valmistetut vektorit siirrettiin kasvitransformaatiota varten <i>E. coli</i>sta <i>A. tumefaciens</i>in bakteerien välisellä konjugaatiolla.</p> <p>Muokattujen <i>CryIA(a)</i>- ja <i>CryIG</i>-toksiinien torjuntavaikutusten tutkimista varten lyhennettyjä geenikonstruktiota ilmentettiin <i>Escherichia colissa</i>. <i>E. coli</i>ssa ilmentetyille <i>Cry</i>-proteiineille kehitettiin puhdistusmenetelmä, joka perustuu niiden liukenemiseen korkeassa ja saostumiseen matalassa pH:ssa. Puhdistettujen toksiinien pitoisuus määritettiin vasta-ainetestausta käyttäen ja aktiivisuutta tutkittiin hyönteisbiotestein kaaliperhosta ja kaalikoita vastaan. Hyönteistestien tulokset kertovat että lyhennettyä <i>cry</i>-geeniä ilmentämällä tuotetuilla <i>CryIA(a)</i>- ja <i>CryIG</i>-toksiineilla on voimakas myrkyvaikutus molempien hyönteislajien toukkia vastaan, ja vaikuttavat pitoisuudet ovat riittävän alhaisia, jotta niiden tuottaminen siirtogeenisessä kasvissa on mahdollista.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>cryIA(a)</i> , <i>cryIG</i> , delta-endotoksiini, torjuntavaikutus, <i>Pieris brassicae</i> , <i>Plutella xylostella</i>			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited <del>Perinnöllisyystieteen laitoksen kirjasto</del> Biotieteiden laitoksen kirjasto			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information			