

‘Gehackte’ bacterie spoort bedorven vlees op

Een team van studenten bio-engineering en biomedische technologie van de Rijksuniversiteit Groningen won in 2012 een internationale biotechnologiewedstrijd. De opdracht, uitgeschreven door de technische universiteit van Massachusetts (MIT), was om het DNA van bestaande bacteriën te veranderen zodat ze nieuwe taken kunnen verrichten.

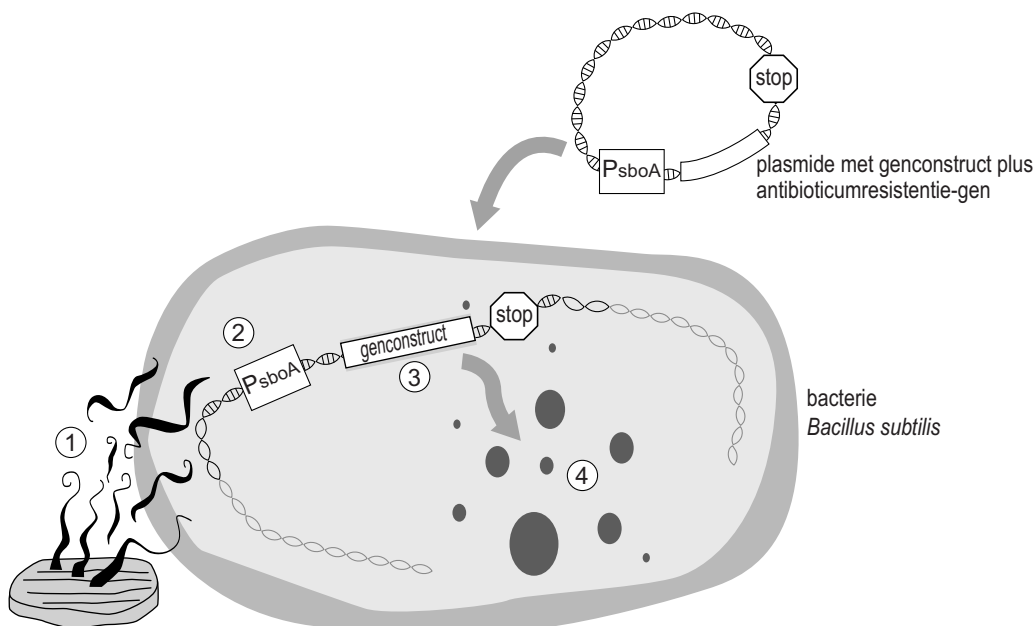
afbeelding 1

De studenten ontwikkelden een bacterie-bevattende sticker (zie afbeelding 1) die in de verpakking van consumptievlees wordt geplakt. De genetisch gemodificeerde bacteriën in de sticker kunnen door een kleurverandering aangeven dat vlees bedorven is.



Het studententeam maakte gebruik van *Bacillus subtilis*, een ongevaarlijke bodembacterie. Ze brachten zelfgemaakte plasmiden met een genconstruct in deze bacteriën. De manier waarop de gemodificeerde bacteriën reageren op bedorven vlees is in afbeelding 2 schematisch weergegeven in vier stappen.

afbeelding 2



- 1 Vluchtige stoffen komen vrij uit het bedorven vlees.
- 2 Deze activeren de promotor PsboA.
- 3 Daardoor start de transcriptie van het genconstruct.
- 4 Het genproduct is een geelgroen pigment (amilGFP).

Zonder een dergelijke test kan de consument alleen afgaan op de houdbaarheidsdatum en zijn of haar zintuigen (kijken, ruiken, proeven) om te bepalen of het vlees nog goed is.

De geur van rottend vlees wordt onder andere veroorzaakt door de zwavelverbinding H_2S en door amines, bepaalde stikstofverbindingen.

Beide worden gevormd door bacteriën in en op het vlees.

- 2p **24**
- Noteer nog een stikstofhoudende verbinding met een sterke geur die door bacteriën gevormd wordt.
 - Bij de afbraak van welke moleculen in vlees kan H_2S ontstaan?

De ontwikkelde stickertest kan het eten van bedorven vlees voorkomen. Van bedorven vlees kun je ernstige diarree krijgen.

Hierover worden twee beweringen gedaan:

- 1 Bacteriën in bedorven vlees produceren stoffen die de darmen irriteren of beschadigen;
- 2 De darmen reageren op de bacteriën uit bedorven vlees door een verminderde peristaltiek, waardoor er meer waterabsorptie plaatsvindt.

- 2p **25** Welke van deze beweringen kan of welke kunnen een verklaring zijn voor de optredende diarree?
- A geen van beide
 - B alleen 1
 - C alleen 2
 - D beide

De snelheid van de verkleuring van de stickers is onder meer afhankelijk van de concentratie bacteriën in de sticker.

Andere variabelen zijn:

- 1 de activering van de promotor $PsboA$ in de bacteriën;
- 2 de stabiliteit van het pigment-mRNA in de bacteriën;
- 3 het aantal ingebrachte plasmiden per bacterie.

- 2p **26** Zet de nummers 1, 2 en 3 onder elkaar op je antwoordblad en geef achter elk nummer aan of de betreffende variabele wel of niet de snelheid van verkleuring beïnvloedt.

De kleurreactie in de bacterie vindt plaats na transcriptie en translatie van het genconstruct in het ingebrachte plasmide.

2p **27** In of aan welk celonderdeel vinden deze processen in de bacterie plaats?

	transcriptie	translatie
A	in het cytoplasma	aan het ruw endoplasmatisch reticulum
B	in het cytoplasma	aan vrije ribosomen
C	in de kern	aan het ruw endoplasmatisch reticulum
D	in de kern	aan vrije ribosomen

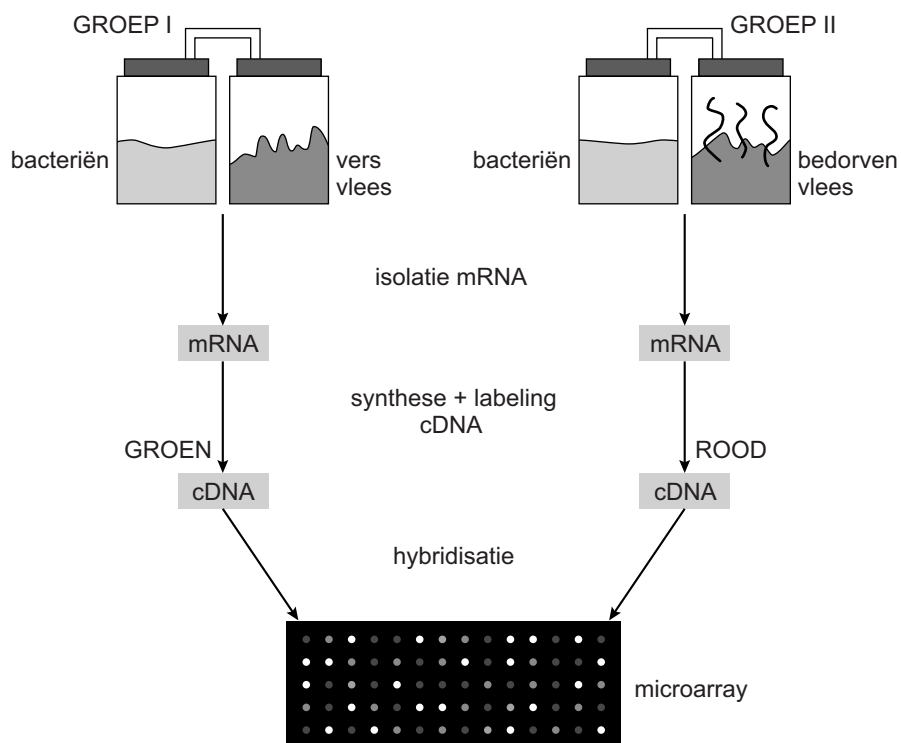
Het plasmide bevat, naast het genconstruct, ook nog een antibioticum-resistentie-gen.

2p **28** Waarom wordt dit gen toegevoegd?

- A** om de gemodificeerde bacteriën resistent te maken voor antibiotica in het vlees
- B** om de gemodificeerde bacteriën te doden wanneer ze in het milieu terechtkomen
- C** om de gemodificeerde bacteriën te onderscheiden van andere bacteriën
- D** om de schadelijke bacteriën in het vlees door de gemodificeerde bacteriën te bestrijden

Het studententeam maakte een DNA-microarray om een promotor op te sporen die reageert op de vluchtige stoffen uit bedorven vlees. In afbeelding 3 is de werkwijze vereenvoudigd weergegeven.

afbeelding 3

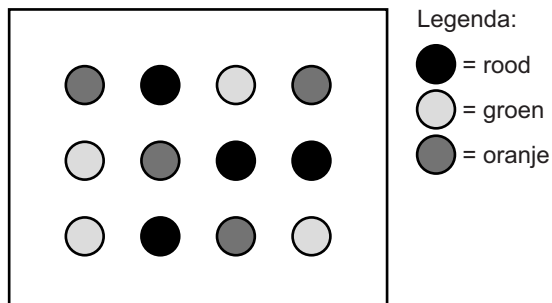


- 1 *B. subtilis* cultures worden blootgesteld aan de lucht van vers vlees (groep I) of bedorven vlees (groep II).
- 2 Tijdens de exponentiële groeifase van de bacteriën wordt mRNA geogst van beide cultures.
- 3 Het mRNA wordt omgezet in cDNA (copyDNA) met behulp van reverse transcriptase. Het cDNA van *B. subtilis* groep I wordt groen gelabeld en dat van groep II rood gelabeld.
- 4 Op een objectglas worden fragmenten cDNA (probes) van een groot aantal genen van *B. subtilis* aangebracht, elk op een afzonderlijke spot. Aan deze 'microarray' wordt een mengsel van groen (groep I) en rood (groep II) gelabeld cDNA toegevoegd.
- 5 Wanneer probe en cDNA complementair zijn, hechten ze aan elkaar (hybridisatie) waardoor deze spots in laserlicht een kleur krijgen.

De studenten analyseerden vervolgens welke kleur de spots hadden: rood, groen of oranje (oranje is een mix van rood en groen).

Een mogelijk deelresultaat van de microarray voor twaalf genen is weergegeven in afbeelding 4.

afbeelding 4



Het doel van de microarray is het opsporen van promotors die geactiveerd worden bij blootstelling aan de lucht van bedorven vlees.

- 2p **29** Welke spots wijzen op de aanwezigheid van een gen met een daarvoor geschikte promotor?
- A alleen de spots die rood kleuren
 - B alleen de spots die groen kleuren
 - C alleen de spots die oranje kleuren
 - D de rode en de groene spots
 - E de rode en de oranje spots
 - F de groene en de oranje spots

Sporen van de genetisch gemodificeerde bacteriën werden verpakt in een zakje van polymethylpenteen dat als een sticker in de verpakking van het vlees wordt geplakt. Het polymethylpenteen heeft microporiën van 1 tot 10 nanometer die wel vluchtige stoffen doorlaten, maar geen micro-organismen.

De sticker bestaat uit twee gescheiden compartimenten. Het buitenste compartiment bevat de sporen van de genetisch gemodificeerde *B. subtilis*. In het binnenste compartiment zitten voedingsstoffen voor de bacteriën. Om het vlees te controleren moet je de wand tussen de twee compartimenten kapot drukken.

De methode is pas echt bruikbaar als de sticker (na kapot drukken van het binnenste compartiment) zichtbaar verkleurt kort voordat het vlees dermate aangetast is dat het je ziek kan maken. Uiteraard zullen de studenten onderzoek doen naar het beste materiaal voor de sticker. Ze zullen ook experimenten moeten uitvoeren om te zorgen dat de sticker een voor de consument bruikbaar en betrouwbaar resultaat oplevert.

- 1p **30** Beschrijf een gegeven dat zij daarvoor in ieder geval uit moeten zoeken.

-
- In de toekomst willen de studenten het plasmide uitbreiden met een 'kill switch'. De kill switch bestaat uit een gen dat codeert voor een stof die de bacteriën doodt en niet giftig is voor mensen. Het gen schakelt aan als specifieke voedingsstoffen in de sticker opraken.
- 2p **31** Welke rol hebben deze voedingsstoffen bij het functioneren van de kill switch?
- A ze dienen als activator
 - B ze dienen als operator
 - C ze dienen als promotor
 - D ze dienen als repressor

- Of de sticker het gaat redden op de markt, hangt niet alleen af van de werkzaamheid. Ook de acceptatie speelt een rol: mensen zijn vaak huiverig voor het vrijkomen van gemodificeerde bacteriën in het milieu. De kill switch kan dit voorkomen door de bacteriën te doden.
- 2p **32** Leg uit waardoor deze gemodificeerde bodembacterie die resistent is tegen een bepaald antibioticum, een gevaar zou kunnen opleveren voor onze gezondheid.