

Transzgenikus növények előállítása

Mészáros Klára
meszarosk@agrar.mta.hu

Növények genetikai transzformációja

Transzformációs technika:

Közvetlen:

A DNS-t közvetlenül juttatjuk be a befogadó szervezet sejtjeibe

Transzformálható fajták:

Célpont: sejt, protoplaszt, szövet, növény

Hatékony *in vitro* regenerációs rendszer

Közvetett:

A DNS bejuttatása közvetítő organizmusok segítségével történik

Vektorok: riporter, szelekciós, hasznos, a beépüléshez és működéshez szükséges szekvenciák



Transzformálás
transzgenikus növény regenerálása

Transzgen beépülésének és működésének kimutatása
Transzgenikus növény felhasználása

Genetikai transzformáció: idegen származású DNS bevitele a növényi genomba hagyományos szexuális út kikerülésével, modern génátviteli módszerek alkalmazásával

Transzgénikus vagy genetikailag módosított (GM) növény: a genomjába idegen származású gén bejuttatása géntechnológiai módszerrel, amely a genomba integrálódik, működik és öröklődik. Ezáltal a GM növények idegen származású fehérjét termelnek.

Ha a géntechnológiával bevitt gén ugyanabból a fajtából származik, mint a módosított növény, akkor ciszgénikus növényről beszélünk.

Transzformációs módszerek

Közvetlen (direkt) transzformáció

- **Kémiai hatásra**
- **Elektromosság vagy ultrahang hatására**
- **Mechanikai hatás**

PEG - polietilén glikol kezelés

- A lipidmembrán instabillá válik
- A szomszédos protoplasztok fúzionálhatnak
- Az instabil lipidmembrán pólusokon jut be a DNS a protoplasztba
- Hátrány, hogy a protoplasztokból történő növényregeneráció korlátozott
- PEG mérgezés, életképesség csökkenés

Génbevitel liposzómákkal

- Liposzóma: membránnal határolt vezikulum. Kívül foszfolipid, belül vízben oldott molekulák, DNS
- előállítás: apoláris oldószerből felületre párolt lipidfilmet vizes oldattal feloldjuk és diszpergáljuk rázással. A DNS-t tartalmazó liposzóma fúzionál a célsejttel. A membránok összeolvadnak, megtörténik a géntranszfer.

Száritott embriók DNS oldatban történő rázatása

- A száraz növényi szövetek membránjának fiziko-kémiai tulajdonságai erősen megváltoznak a kiszáradás folyamán
- így a DNS óriásmolekulák megfelelő gyakorisággal bejuthatnak a sejtekbe, áztatással
- Pillangós és gombafajok embrióin próbálták ki a módszert
- Tranziens génexpresszió kiváltására alkalmas

Elektroporáció

Elektromos impulzusokkal a sejtek DNS-felvétele fokozható

Rövid, megfelelő erősségű elektromos erőtér tranziens lyukakat eredményez a membránban.

Protoplaszt, intakt növényi sejt, éretlen embrió

Egyszerű, gyors, olcsó de hatékonysága alacsony



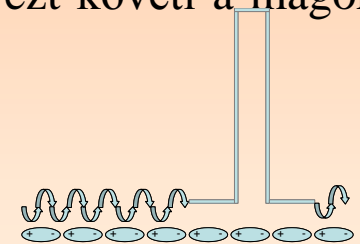
Elektrofúzió

Váltóáramú elektromos térben a protoplasztok dipólusként viselkednek, és láncszerűen összetapadnak

Nagyfeszültségű egyenáram hatására a protoplasztok összeolvadnak, és ezt követi a magok fúziója

A fúziós gyakoriság nagy és a fúziós termékek életképesek

Nincsenek mérgezési tünetek, mint a PEG-nél



Ultrahanggal történő génbevétel Szonikáció

A protoplaszt sejteket 20 kHz ultrahang hatásának teszik ki, a megfelelő génkonstrukciót tartalmazó plazmid jelenlétében, oldatban

A túlélő protoplasztok életképesek és nagy regenerációs kapacitással rendelkeznek

DMSO hatására a regenerációs képesség még tovább nő és a tranziens génexpresszió is nő

Előnye, hogy egyszerűbb módszer, mint a PEG vagy az elektroporáció

Mechanikai úton történő génbevitel

Transzformáció szilikon karbid tűk felhasználásával

- Intakt növényi sejtek használhatók kiindulásként
- A sejteket DNS-tartalmú folyékony táptalajban rázatják szilikon-karbid tűkkel együtt
- A szilikon karbid tűk mikroméretű injekciós tűkként működnek áthatolnak a sejtfalon és sejtmembránon és ily módon bejuttatják a rájuk tapadt DNS-t a sejtbe
- Előny: egyszerű, olcsó
- Hátrány: sejtek károsodása, regenerációs hatékonyság alacsonyabb

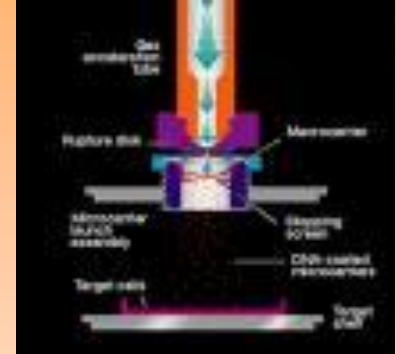
Mikroinjektálás

- A DNS oldat közvetlen beinjektálása a protoplasztba vagy a sejtmagba
- A műveletet mikroszkóp alatt, mikromanipulátorral végzik
- manipulátor egyik karja rögzíti a protoplasztot, a másik beinjektálja a DNS oldatot adagoló szivattyú segítségével áthatolva a sejthártyán



Biolisztikus transzformáció, „génágyú”

- Intakt sejtek transzformációjára alkalmazott leghatékonyabb módszer
- A DNS-t 0.5-2 μm átmérőjű arany vagy wolfrám részecskére rögzítik (mikrokarrier)
- Ezeket a részecskéket nagy sebességre felgyorsítják, nagynyomású He vagy N_2 gázzal
- A részecskék eltalálják a célszövetet, áthatolnak a sejtek falán, és a DNS is bejut velük a sejtbe
- a túlélő sejtek osztódnak és belőlük megfelelő körülmények között növény regenerálható
- Előny: valamennyi növény esetén alkalmazható,
- a leghatékonyab módszer jelenleg



Biolisztikus transzformáció, „génágyú”

➤Aranyszemcse mérete (0.4-1.2 μm)
és mennyisége (29-235 μg /lövés)

➤A mirohordozóra vitt oldat
összetétele

2.5-20 μg plazmid vagy

lineáris DNS

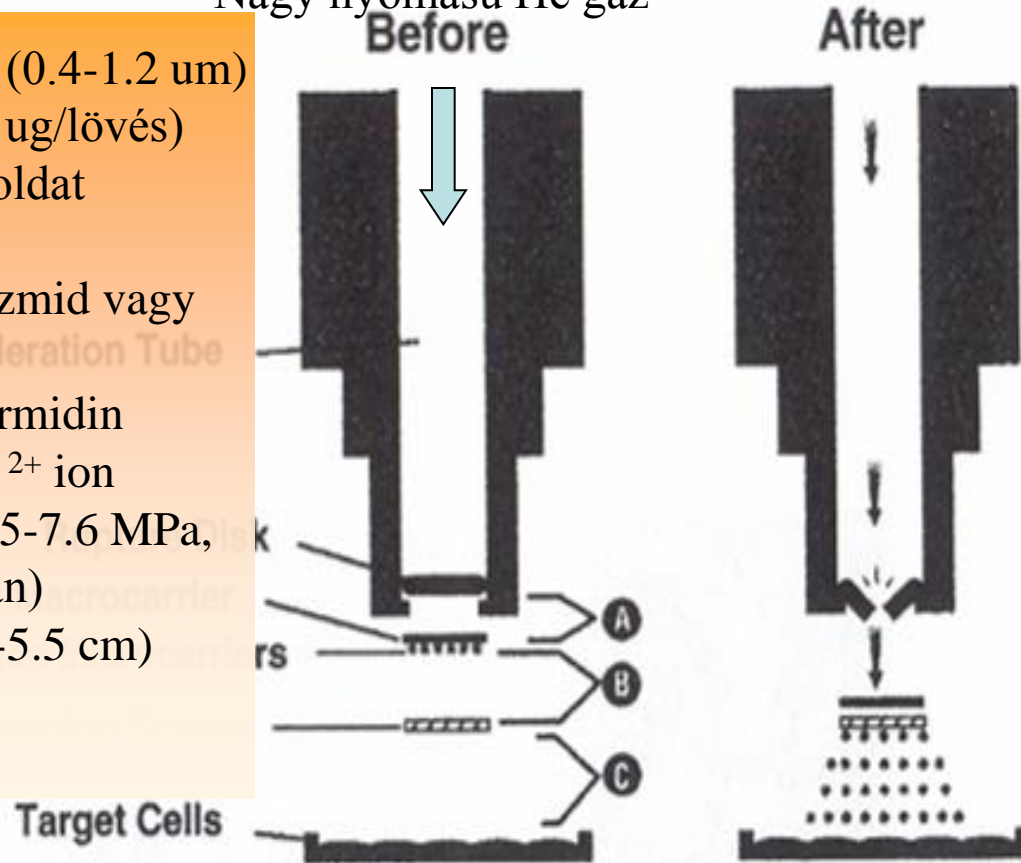
8-16 mM spermidin

0.2-1.9 M Ca^{2+} ion

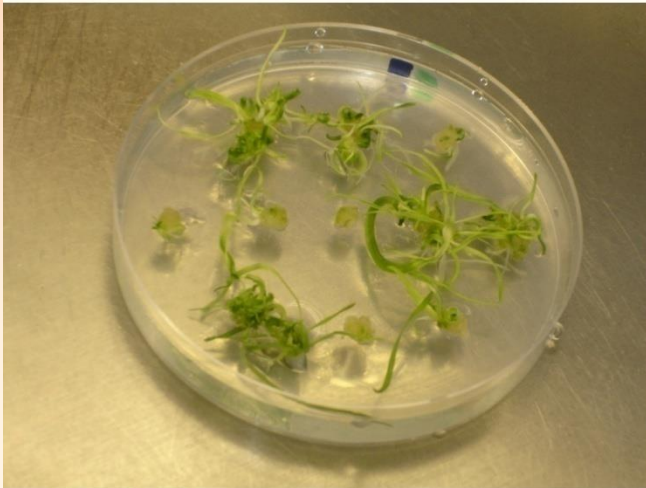
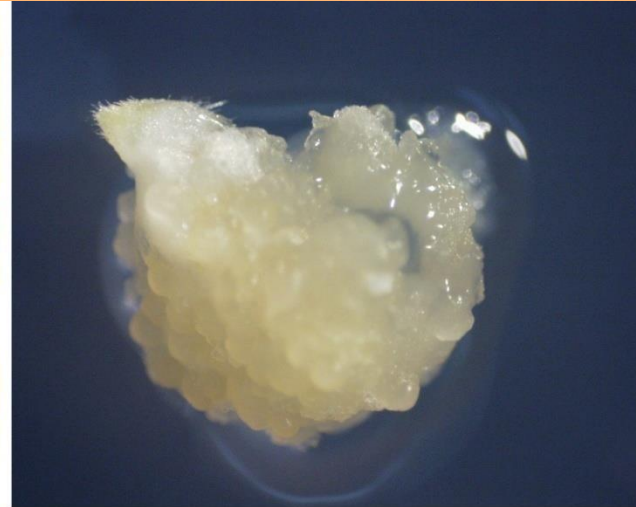
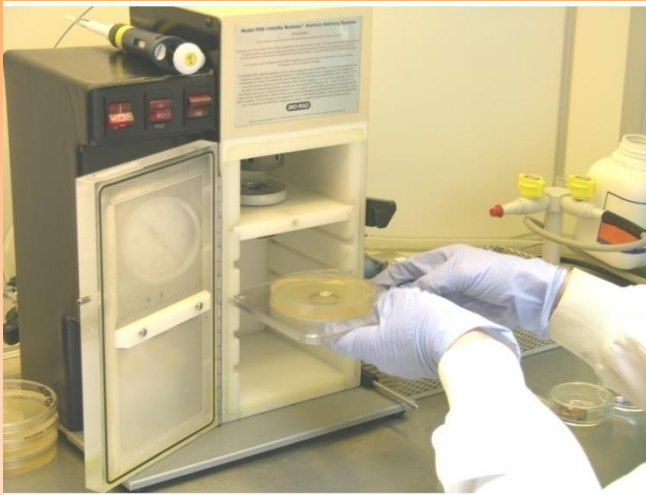
➤a He gáz nyomása (4.5-7.6 MPa,
68-71 Hgmm a kamrában)

➤A lövési távolság (2.5-5.5 cm)

Nagy nyomású He gáz



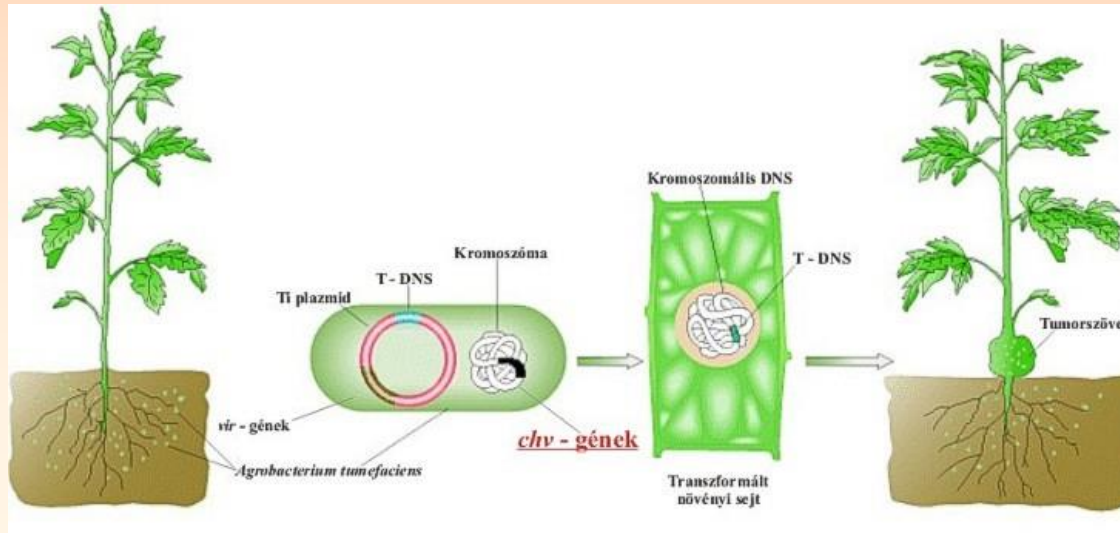
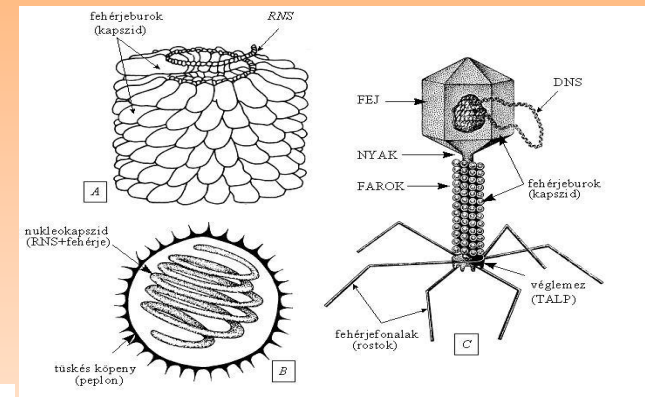
Biolisztikus transzformáció



Transzformációs módszerek

Közvetett (indirekt) transzformáció

- Vírus által közvetített
- Baktérium által közvetített



Indirekt, vírus vektor – közvetített transzformáció

CaMV , karfiol mozaikvírus:

- kettős szálú DNS vírus, hossza 8 kb,
- rövid kb 1 kb DNS vihető át vele
- fertőzés vektorai a levéltetvek vagy mechanikus
- szűk a fertőzhető növények köre, betegségben el is pusztulnak

Gemini vírusok:

- egyfonalas DNS vírusok, genomméret kb 2.5 kb
- beépítendő DNS mérete nem limitált a köpenyfehérje hiánya miatt
- fertőzés vektorai a levéltetvek
- gazdaspecificitásuk széles

RNS-vírusok

- cDNS formában integrálódik a gazdagenomba
- Kis valószínűséggel integrálódik a genomba
- Ajánlott, ha csak egy generációban szeretnénk bevinni egy tulajdonságot pl. vírus rezisztencia

Transzpozon vektorok

Ez a DNS szekvencia képes ugrálni a genom mentén

Létezését először kukoricában mutatták ki

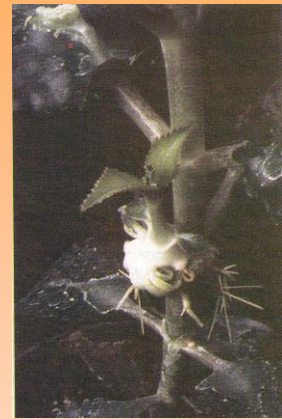
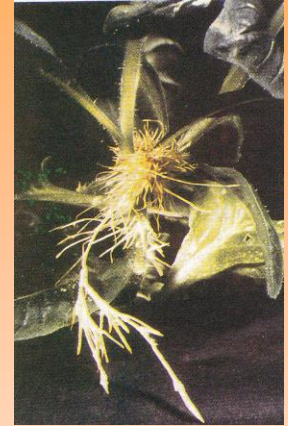
Két szomszédos inszerciós elem+közbeékelődött gén komplexe, mely bármely DNS lehet

Indirekt, *Agrobacterium* – közvetített transzformáció

Agrobacterium tumefaciens és *Agrobacterium rhizogenes*

talajban élő Gram-negatív baktérium, sebzési helyeken gyökérgolyvásodást vagy hajsál gyökeresedést okoz (crown gall)

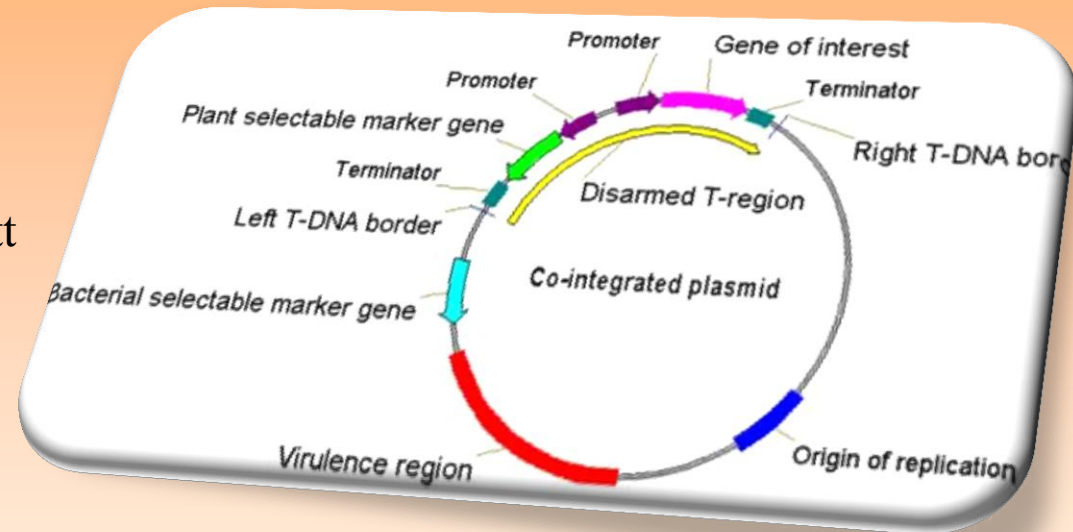
Gazdakörük rendkívül széles



- A növény sérülésekor felszabaduló jel érzékelése mozgás és kapcsolódás sérült növényi sejtekhez
- Kétkomponensű érzékelő rendszer aktivációja a transzfer (T-)DNS kivágásához,
- A baktérium- és növényi sejt közötti átjáró létrehozása
- DNS-fehérjekomplex felépítése és bejuttatása a növényi sejtbe,
- A komplex beszállítása a sejtmagba, és a DNS beépítése a növényi kromoszómába.


Agrobacterium – közvetített transzformáció

- cirkuláris Ti és Ri plazmid önállóan szaporodik, 100 génje van, opinokat termel N forrásként a baktériumnak
- Egy része a T-DNS (kb. 21-23 kb) - a tumor képződésért felelős
- Ez a határszekvenciák által közrefogott rész (T-DNS vagy bármely DNS darab 50 kb) hatékonyan átvivődik a gazdanövény genomjába
- Vir gének (A, G, E, B, F, H) - átvitel



Ti-plazmid T-DNS génjei helyére építjük be a bevinni kívánt gént a határszekvenciák közé

T-DNS átalakítása növényi vektorrá

- A T-DNS génjei közül csak az opin- vagy nopalinszintetáz géneket hordozó plazmidokat hoztak létre  transzformáció
- Az opinokat vagy nopalint stabilan expresszáló és örökítő nagyszámú transzgénikus növények létrehozása
- A transzgénikus növények azonosítása opin vagy nopalin kimutatásával

T-DNS átalakítása növényi vektorrá

- Bakteriális, élesztő és állati gének promótereit inaktívak T-DNS-be építve.
- *E. Coliban* a T-DNS génjeinek promótereit antibiotikum rezisztencia gének kódoló régiójával fúzionáltatták és poliadenilációs szignállal látták el (pBR).
- Átvitel *Agrobacteriumba* konjugációs rendszerrel.
- Rekombináció a Ti plazmiddal.

Bináris T-DNS vektorok

A virulencia régió és a T-DNS határszekvenciák elkülönítése két külön plazmidon.

- Bakteriális szelekciós gént tartalmaz,
- A vektor *Agrobacterium*-ba juttatásához a konjugációt biztosító *oriT* szekvenciát tartalmazzon,
- A T-DNS régiót T-DNS határszekvencia határolja,
- Növényi szelekciógént tartalmazzon
- T-DNS-en belül endonukleáz felismerőhelyeket tartalmazzon

Helper plazmid tartalmazza a *vir* géneket

Vektorok

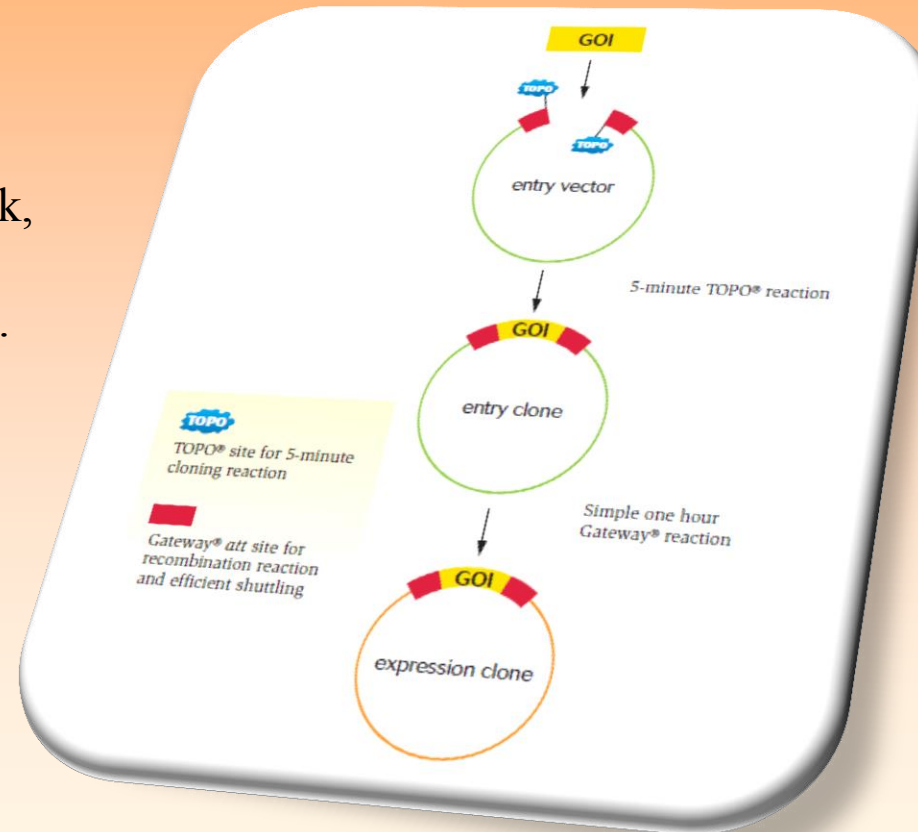
Definíció: Az a DNS szakasz vagy molekula, mely egy adott sejten belül képes replikálódni, pl.

- növényi vírusok (kettős szálú, egyszálú, RNS vírus)
- baktériumok plazmidjai a leggyakrabban használt vektor.
- A plazmidok kicsi, cirkuláris DNS-molekulák, amelyeken egy másolatindító (origin of replication) szekvenciárészlet is be van építve.
- organelláris cirkuláris DNS
- Clean DNA transformation

Követelmények:

- önállóan replikálódjon
- restrikciós enzim hasító hely idegen gén beépítésére alkalmas
- antibiotikum-rezisztencia marker
- riporter gén,
- promóter

Gateway technology



Génkonstrukciók

A funkcionális *génkonstrukciónak* két alkotóelemmel kell rendelkeznie.

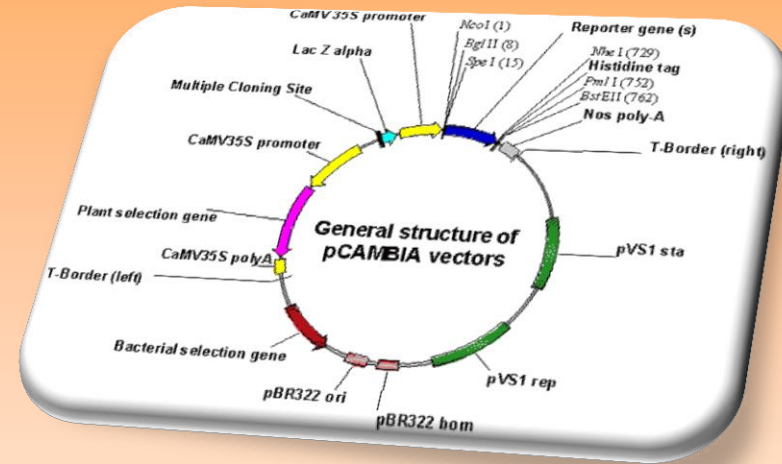
➤ DNS-szakasz a **kódozó régió**, mely egy információközvetítő molekula, az RNS átmásolásához (transzkripció) és adott esetben a fehérjék szintéziséhez (transzláció) szükséges információt tárolja.

➤ Azok a **szabályozó** DNS-szekvenciák képezik, melyek az RNS átírásának indítását, végrehajtását és befejezését, valamint az előállított RNS-molekula további szerkesztését irányítják.

Ezek a szabályozó DNS-elemek (például a promoter és a terminátorrégiók) általában a kódozó régió startpontja (ATG) előtt és végpontja (TAA, TAG vagy TGA) után, vagy akár abba beékelődve (intronok) helyezkednek el.

Génkonstrukciók

- Riporter gének
- Szelekciós gének
- Célzott funkciójú gén
- Promóterek:
 - Konstitutív
 - Szövet vagy sejt specifikus
 - Indukálható
 - Egyedfejlődéstől függő



Indukciós jel	Faj	Kezelt növényi rész	Hatékonyság	
Kémiai: β-estradiol	lúdfű	Hajtás, kallusz, csíráztatott mag	15-60%	Zuo et al. 2001
Hősokk	lúdfű	csíranövény		Hoff et al. 2001
	dohány	mag, levél	40-100%	Liu et al. 2005 Wang et al. 2005
	paradicsom	Hajtás internódium	5-14%	Cuellar et al. 2006
	kukorica	Kallusz, éretlen embrió	100%	Zhang et al. 2003
Embrió specifikus	szója	Szomatikus embriógenézis	5-60%	Li et al. 2007
Microspora specifikus	lúdfű	Korai pollen	100%	Mlynárová et al. 2006
	dohány		100%	

A növény sérülésekor felszabaduló jel érzékelése mozgás és kapcsolódás sérült növényi sejtekhez

-**Window of competence**'- a sebesülés utáni kritikus periódusban kell az Agrobaktáriumnak jelen lenni a válaszreakció kialakulásához, hatékony transzformáció eléréséhez.

A sebesülés hatására védekező reakció indul be.

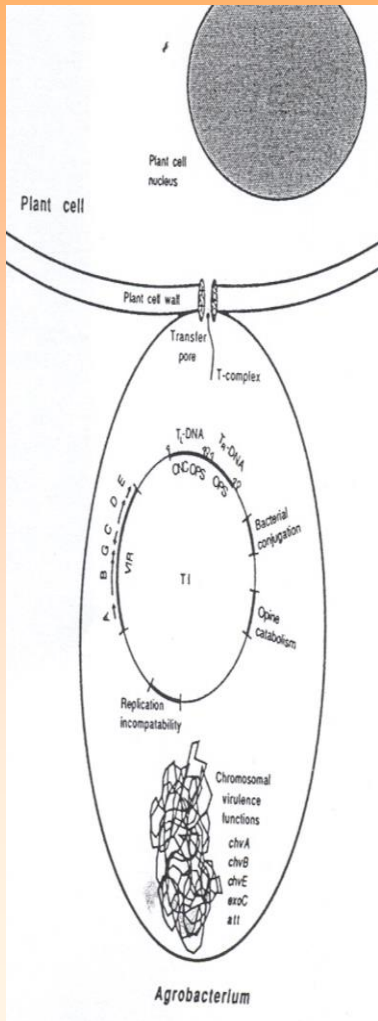
A sejtosztódás és a sejtfalat alkotó poliszacharidok és a lignin szintézise közben jellegzetes vegyületek szabadulnak fel (fenolos komponensek, cukor és származékai), melyek az Agrobaktérium számára jelek (SIGNAL).

Egyszikűekben a sebzés hatására sejtelhalás történik, így nem képződik elég SIGNAL, ezért okozhat nehézséget transzformálásuk.

-**Kemotaxis**: *A. tumefaciens* számára vonzó vegyületek (kemoattraktant), szerves savak (szukcinát, p-hidroxybenzoát), bizonyos aminosavak (valine, arginin), szénhidrátok (cukrok), oldható fenolok, hatására a baktériumok a sebzés irányába mozognak.

A baktérium sebessége 60-ról 500 $\mu\text{m}/\text{sec}$ -re nő hatásukra laborban.

A növény sérülésekor felszabaduló jel érzékelése mozgás és kapcsolódás sérült növényi sejtekhez



Baktérium – növényi sejt fizikai kölcsönhatása

Kromoszómális gének irányítják:

chvE gén – cukor-kötő fehérjét kódol, mely a sejtmembránon található kemotaxis receptorokkal kölcsönhat, sérült sejt felismerésben játszik szerepet

chvA – export fehérje (ciklikus β -1-3-glukán) , kapcsolódás aktivitását növelheti

Befolyásolja a baktérium gazda specifitását és virulenciáját

- a baktériumok meghatározott helyre kötnek, néhány 100 baktérium /sejt

Kétkomponensű érzékelőrendszer aktivációja a transzfer (T-)DNS kivágásához

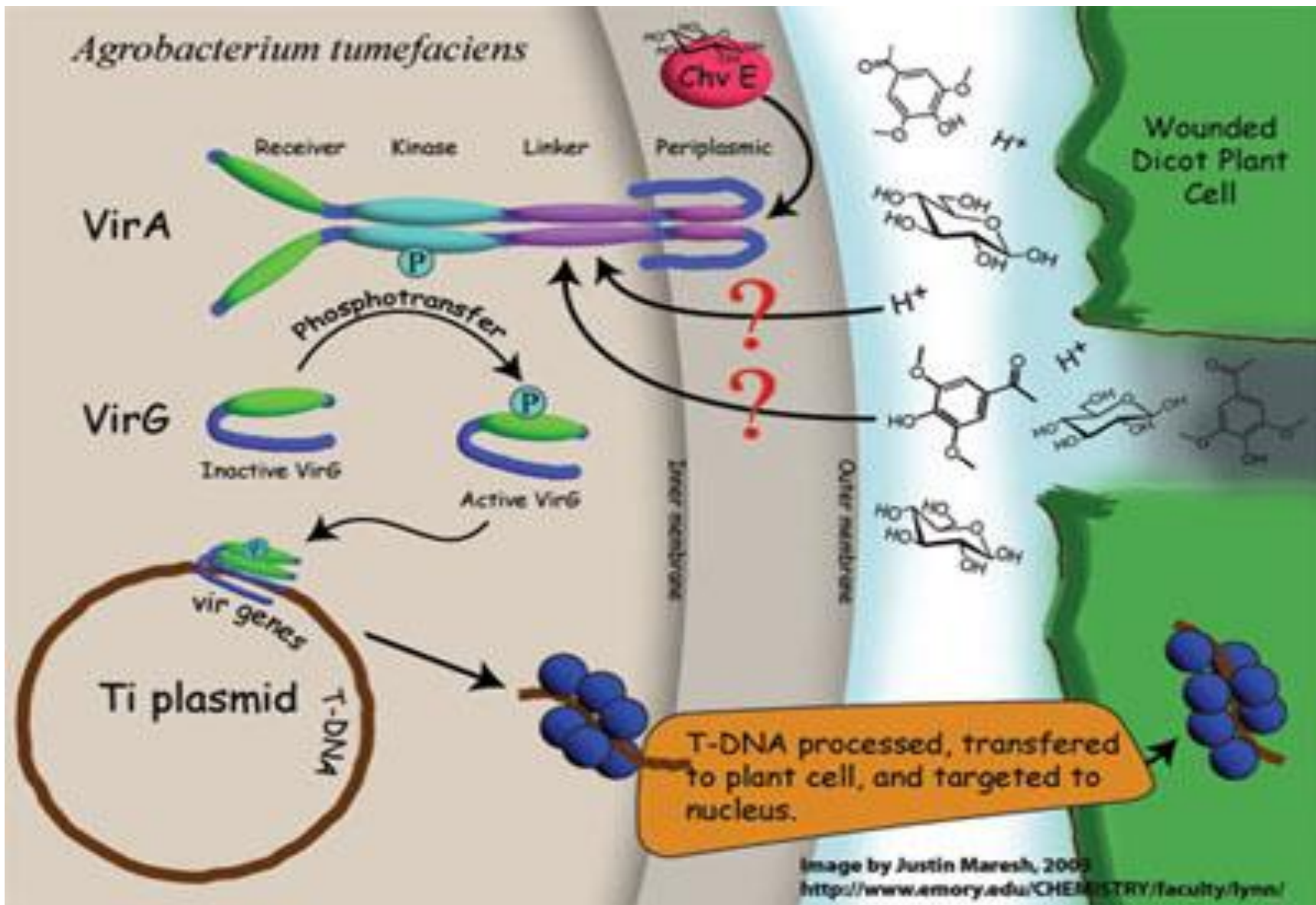
-vir gének – a T (transzfer)-DNS szintézisében és növényi sejtbe való átvitelében játszanak szerepet a Ti-plazmidon található

Ez a folyamat szabályozott és függ attól, hogy a baktérium milyen érzékenyen reagál a növény sebzésre adott válaszára (fenolok, cukrok)

chvE-cukor komplex képződése és kölcsönhatása megváltoztatja a VirA konformációját, alacsony fenol koncentráció esetén aktiválja a baktérium mozgását a növényi sejt irányába

VirA-VirG-kéttagú szabályozó rendszer:

- VirA: Membránkötött kémiai receptort kódol. Érzékeli a növényi signált, magas fenol koncentráció esetén foszfokináz aktivitása lesz, melynek hatására egyik hisztidinjének foszfát csoportját átadja a VirG aszparaginjának, ezzel aktiválja.
- a VirG-transzkripciós faktor, tartalmaz egy DNS és egy ATP kötő helyet is, saját promóterét írja át, aktiválja a szabályozó rendszert (*virB, C, D, E, F, H és tzs*) a promóter régió vir-box szekvenciájához történő kötődés révén



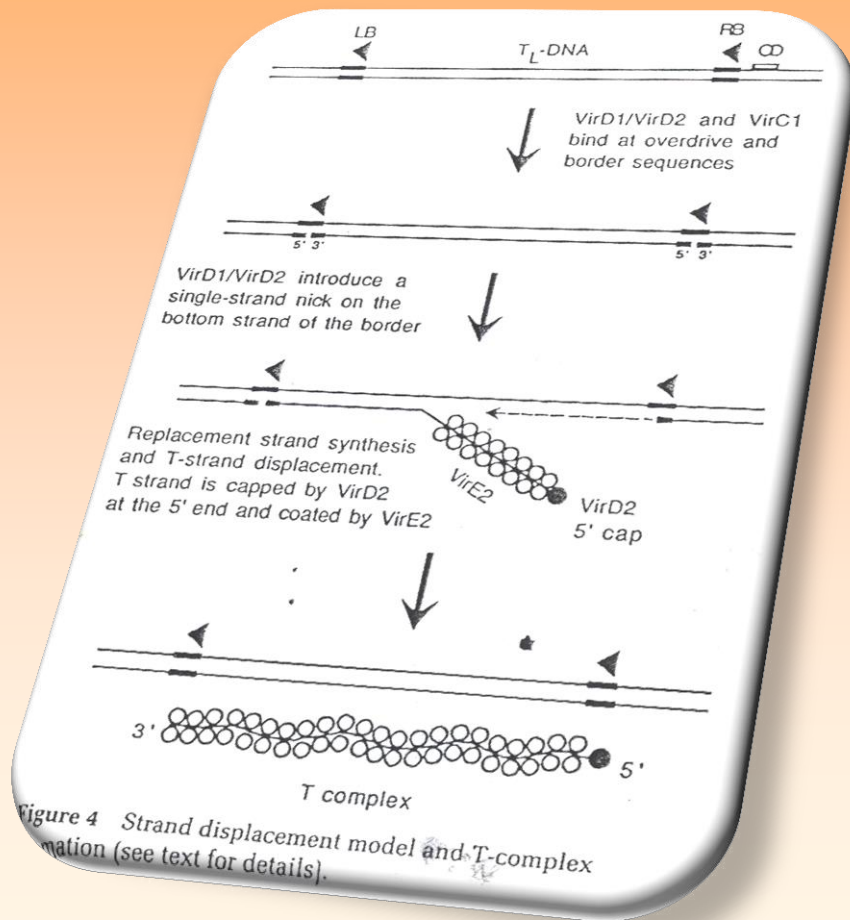
A T-DNS szállítás folyamata

1. Szállítható intermedier előállítása

- VirD1 kitekeri a DNS-t, VirD2 elhasítja az alsó szálát
- DNS szintézis kezdődik, a keletkező egyszálú DNS a T-strand
- VirE2 fehérje hozzákötődik, hogy megvédje a nukleázoktól – T-komplex

2. T-komplex szállítása

- A mechanizmus kevésbé ismert
- *vir* -specifikus membrán pólus keletkezik, melyen a T-komplex bejuthat a sejtbe
- A 11 *virB* közül legalább 3 részt vesz a szállításban, géntermékeik membránhoz kötöttek, befolyásolják a virulenciát, a T-DNS szállító rendszer szubsztrát specificitását befolyásolják



T-DNS mozgása és integrációja sejten belül

- Szállítás: T-komplex részei a VirD2 és a VirE vezetik a T-DNS-t a sejtmagba
 - VirD2 a sejtmag szignáljait ismeri fel
 - VirE védi az egyszálú DNS-t (valószínű)
 - VirD2 okozta polaritás segíti a növényi genomba integrálódást
- Integráció:
 - Illegitim rekombináció
 - Az integrálódott DNS a növényi DNS-el azonos módon működik tovább (transzkripció, poliadenlált mRNS képződése, RNS mozgása, transzláció)
 - Egy vagy több inzerció is létrejöhet, tandem épül a növényi genomba a T-DNS
 - A T-DNS határszekvenciái mentén a növényi genom átrendeződésre képes, duplikációk, deléciók

T-DNS mozgása és integrációja sejten belül

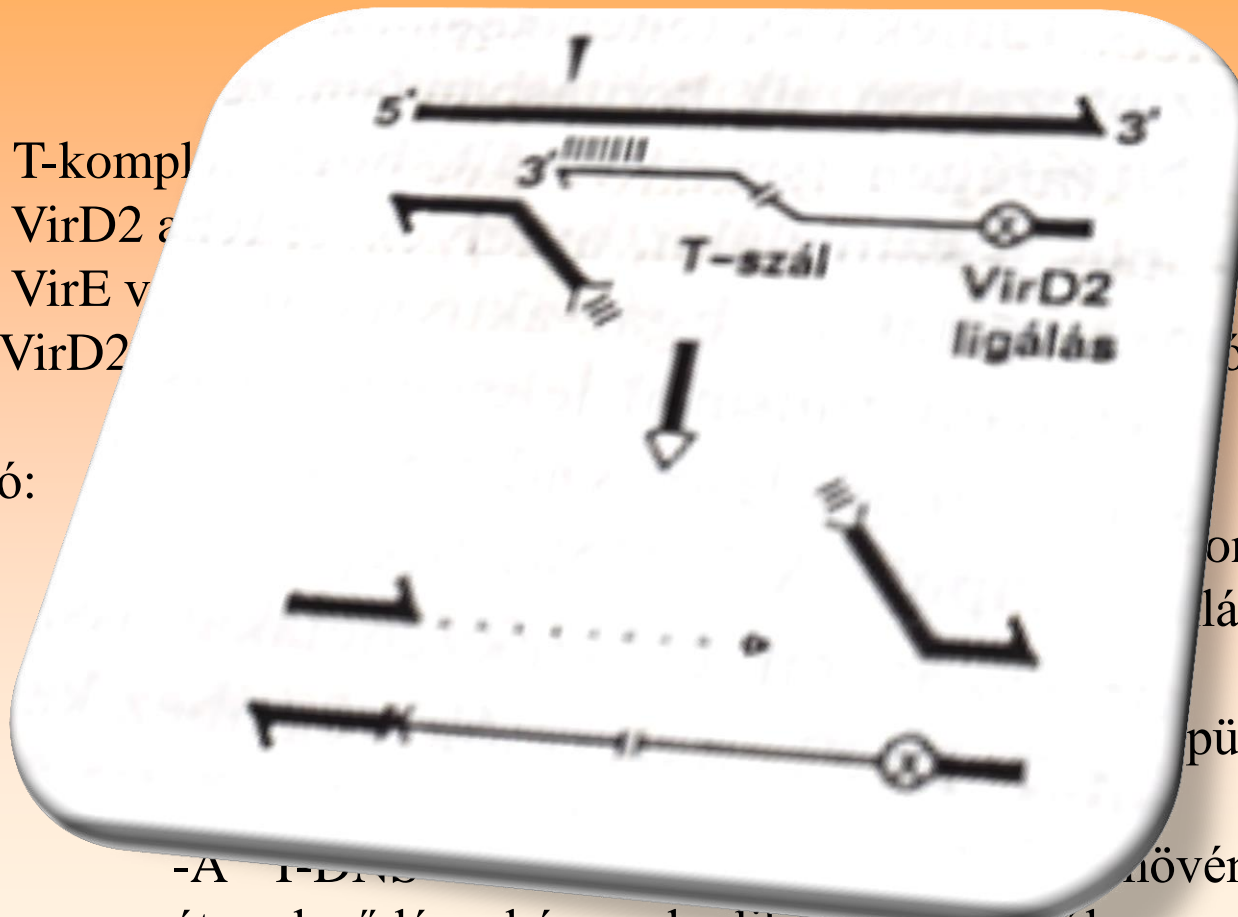
-Szállítás: T-kompl

- VirD2 a

- VirE v

-VirD2

-Integráció:



-A T-DNS

átrendeződésre képes, duplikációk, deleciók

sejtmagba

bódást

onos módon

lált mRNS

pül a növényi

növényi genom

Biolisztikus

- A bejuttatott DNS mennyisége nagy:
 - Több kópiában történő beépülés
 - Komplex átrendeződést
 - Génexpresszió gátlása

- A beépülés helye véletlenszerű:
 - hátrányos lehet a gén működésére

- A belövés során fragmentálódik a DNS: nagy molekulatömegű DNS nem juttatható be

Agrobaktériumos transzformáció

- A sejtbe legfeljebb csak néhány T-DNS molekula jut be:
 - Alacsonyabb kópiaszámban épül a genomba
 - Csökkenti a szerkezeti átrendeződések esélyét
 - Növeli a génexpresszió valószínűségét

- A transzgén beépülése a transzkripciósan aktív régiókba preferáltan történik

- Nagy molekulatömegű DNS bevitele lehetővé teszi egy lépésben több gén beépítését

Növények genetikai transzformációja

Transzformációs technika:

Közvetlen:

A DNS-t közvetlenül juttatjuk be a befogadó szervezet sejtjeibe, mechanikai, kémiai vagy valamilyen erőter segítségével

Közvetett:

A DNS bejuttatása közvetítő organizmusok segítségével történik

Vektorok: riporter, szelekciós, hasznos, a beépüléshez és működéshez szükséges szekvenciák



Transzformálható fajták:

Célpont: sejt, protoplaszt, szövet, növény

Hatékony *in vitro* regenerációs rendszer

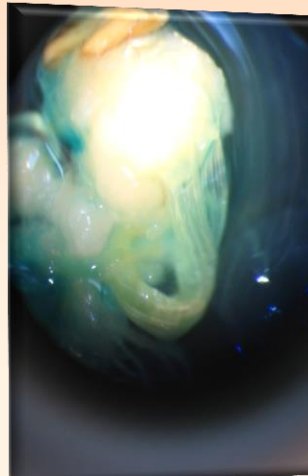
Transzformálás
transzgenikus növény regenerálása

Növény regeneráció

Genetikai módosítás

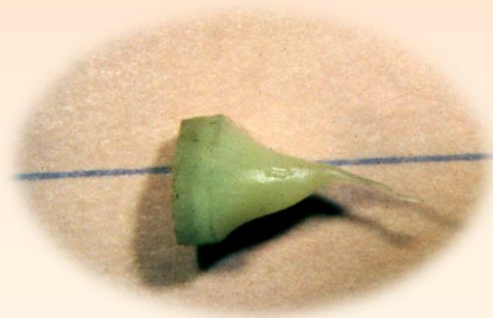


- Növény → Sejt → Növény
- Determinált sejt → Dedifferenciáció → Redifferenciáció

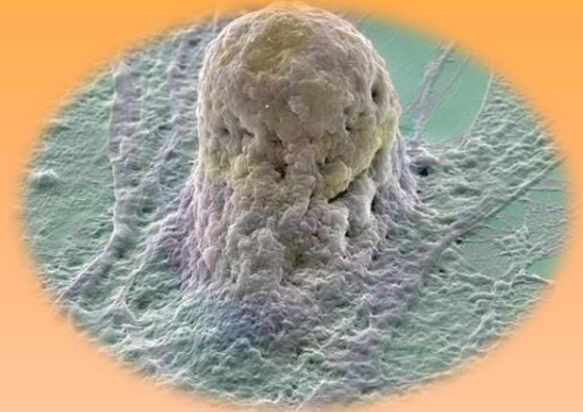


Növényi sejt és szövettenyésztési technikák

- Azokat a sejt és szövettenyésztési technikákat jelentik, melyekkel a növényi izolátumok *in vitro* életben tarthatók, szaporíthatók és belőlük új növény regenerálható



Totipotencia:



- A soksejtű növény minden élő sejtje teljes értékű, totipotens, vagyis teljes génkészlettel, genetikai és biokémiai potenciállal rendelkezik, és megfelelő körülmények mellett képes lehet önálló fejlődésre. Így egy izolált sejtből regenerálható a teljes növény.

Merisztéma:

- Osztódó szövet:

Elsődleges: még differenciálatlan

Differenciálódáskor az ősméristéma sejtjeiből olyan merisztémák alakulnak ki, amelyek osztódnak, de csak egyféle szövettípust képesek létrehozni. A többi gén gátlás alá kerül.

Másodlagos: differenciált szövetből jön létre



Kallusz



- A már nem osztódó, differenciált szövetből másodlagosan kialakult növényi osztódó szövet. A kalluszképződés megindulásában igen nagy szerepet játszanak a növényi hormonok.
- Szövettenyésztéskor az explantum szilárd táptalajra helyezésével és hormonkezelésével érik el a dedifferenciációt, így osztódáskor differenciálatlan parenchima sejtek jönnek létre.

Explantum

- Az a növényi rész, izolátum, melyet táptalajra helyezünk fenntartás, növekedés és fejlődés céljából.

- Leggyakrabban használt explantumok:

Szomatikus sejtek:

Differenciált:

Gyökér

Levél

Differenciálatlan:

Hajtáscsúcs (Ball 1946)

Éretlen virágzat

Embrió-éretlen, érett

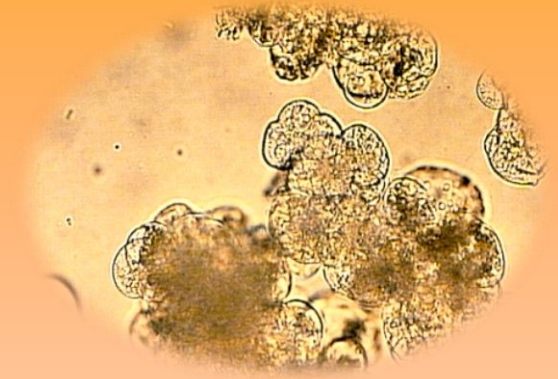
Generatív sejtek:

Portok-mikrospóra

Ovárium-petesejt



Sejtszuszpenzió



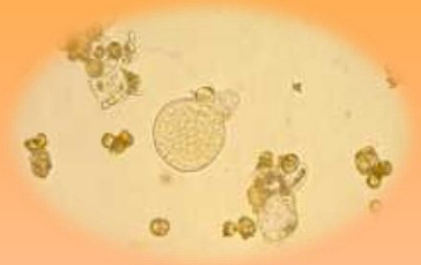
- Embriogén kultúrából hozható létre
- A sejtagregátumok folyékony táptalajban történő diszperziójával
- Nagy regenerációs képesség
- Transzformációs kísérletekben gyakori alkalmazás
- Egy vagy több sejtből kiinduló regeneráció?

Protoplaszt kultúra



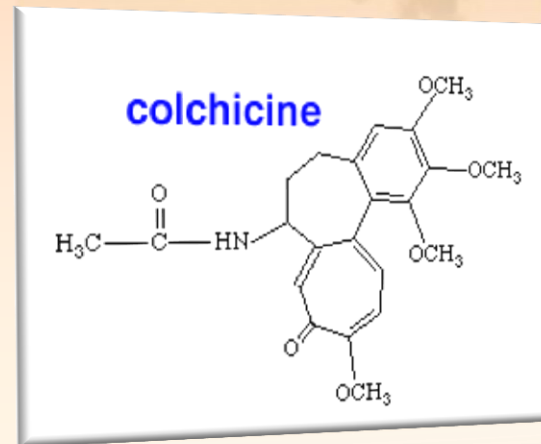
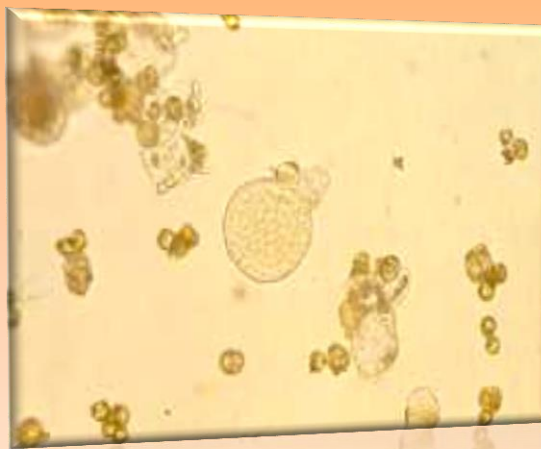
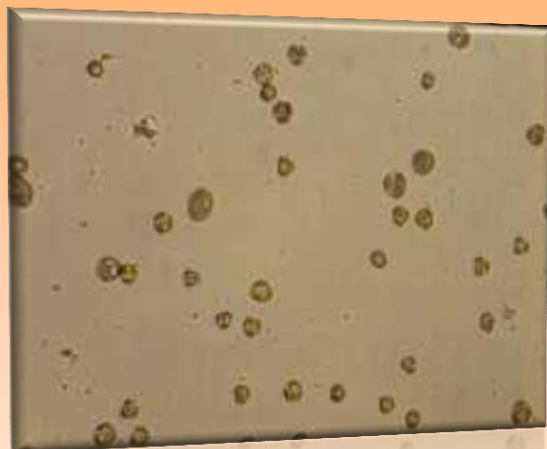
- A protoplaszt olyan sejtmembránnal határolt növényi sejt, melyek sejtfalát eltávolítottuk
- Sejtszuszpenzióból vagy mesophylumból hozható létre
- Növények esetében az egyetlen regenerációs rendszer, mely egy sejtől indul ki
- Transzgénikus növény előállítás, tranziens génexpressziós vizsgálatok

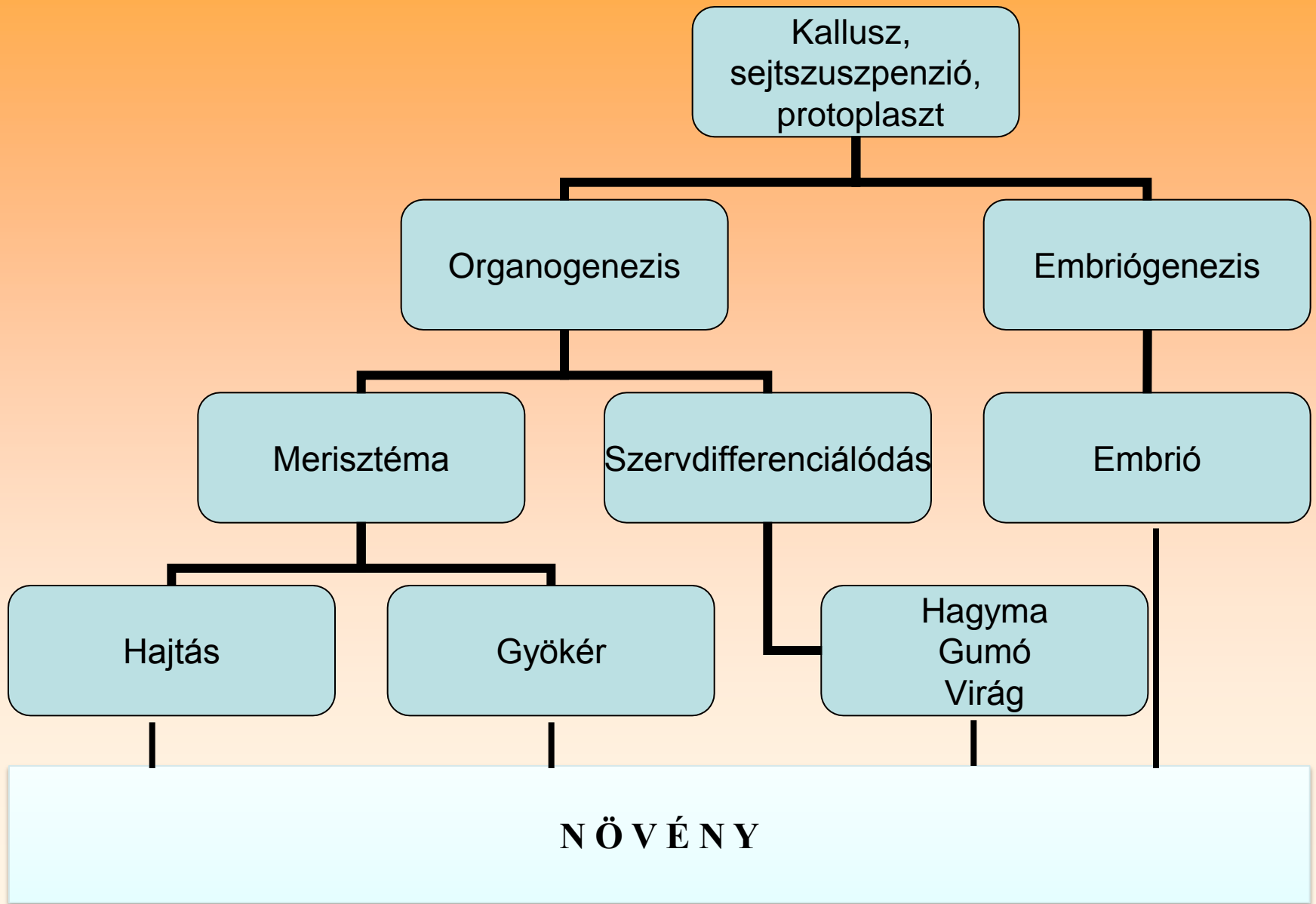
Haploid szövettenyésztési technikák



- A növényi gametophyton *In vitro* tenyésztése
Mikrospora, petesejt, ...
- Rediploidizáció -> homozigóta növény
- A legelterjedtebb *in vitro* nemesítési technika
- Transzformációja egy lépésben
homozigóta transzgénikus növényt eredményez

Haploid szövettanyésztsési technikák





Növényi sejt és szövettenyésztés

- Szintetikus táptalajok
- Steril környezet (tenyésztés, módosítás ...)
- Mesterséges környezet

Táptalaj

- Olyan folyékony vagy szilárd mesterséges környezet, mely tartalmazza a növényi sejtek, szövetek, szervek életben maradásához, növekedéséhez és fejlődéséhez szükséges összes makro- és mikroelemet és szerves kiegészítőket

Táptalaj összetevői

- makro - és mikroelemeket
- szilárdító anyagot– agar, gelrite
- Cukor forrást– szaharóz
- Vitaminokat, aminosavakat
- Hormonokat
- Egyéb kiegészítőket: citromsav, C- -vit., aktív szén szén

Murashige és Skoog (1962) táptalaj (MS):

- Makroelemek:
1650 mg/l NH_4NO_3 ; 1900 mg/l KNO_3 ; 440 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 370 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 170 mg/l KH_2PO_4 .
- Mikroelemek: 6,2 mg/l H_3BO_3 ; 16,9 mg/l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; 10,6 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,83 mg/l KI; 0,25 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,025 mg/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,025 mg/l $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 37,3 mg/l $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$; 27,5 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$.
- Vitaminok: 0,5 mg/l nikotinsav; 0,5 mg/l piridoxin HCl; 0,1 mg/l tiamin HCl; 2,0 mg/l glicin; 100 mg/l mio-inozit.
- Szilárd táptalaj esetén szükséges még 0,7% agar hozzáadása.
- A táptalaj pH-ját 5,7–5,8 értékre 1 M KOH-oldattal állítjuk be. A táptalaj sterilizése 121 °C-on 20 percig történik.

Táptalaj

- **Kallusz-indukáló táptalaj (CIM):** MG táptalaj (MS táptalaj 1,6% glükózzal); 5 mg/l naftilecetsav (NAA); 0,1 mg/l benzilaminopurin (BAP); 250 mg/l klaforán; 50 mg/l kanamicin vagy 1 mg/l higromicin.
- **Hajtás-indukáló táptalaj (SIM):** MG táptalaj (MS táptalaj 1,6% glükózzal); 2 mg/l zeatin; 0,02 mg/l naftilecetsav (NAA); 0,002 mg/l gibberellinsav (GA3); 250 mg/l klaforán; 50 mg/l kanamicin vagy higromicin.
- **Gyökereztető táptalaj (RIM):** MS táptalaj; 250 mg/l klaforán.

Növényi hormonok

- Auxinok- Indolecetsav, indolvajsav, naftilecetsav, 2,4 diklórfenoxi-ecetsav (2,4-D)
- Citokininek– Kinetin, benziladenin, zeatin
- Gibberellin - ritkán rügynyugalom ellen

Döntő az auxin + citokinin arány

- Sok auxin + kevés citokinin– kallusz indukció
- Kevés auxin + kevés citokinin -hajtásnövekedés
- Kevés auxin + sok citokinin –sarjadzás
- Csak citokinin– kallusz növekedés és regenerálódás
- Csak auxin - gyökereztetés gyökereztetés

Mesterséges környezet

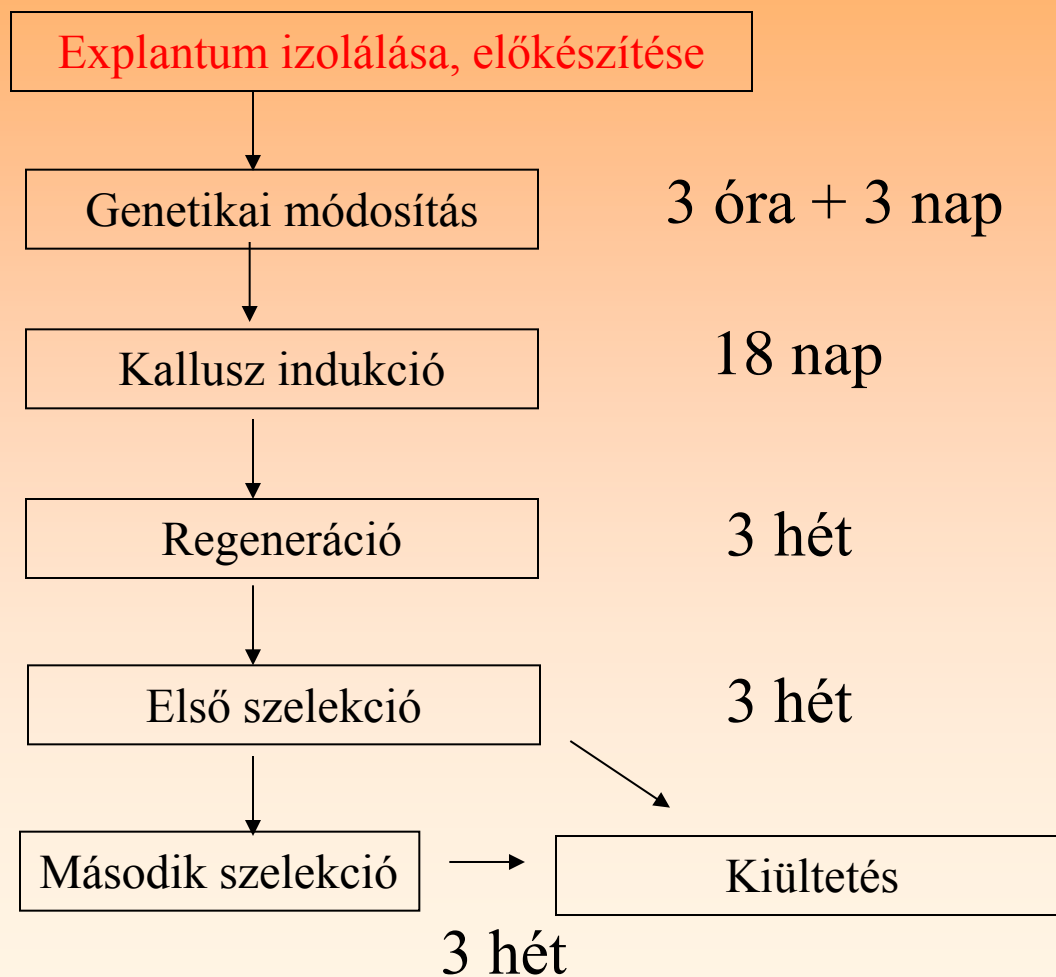
- Hőmérséklet (20-30 °C)
- Fény-sötét

Regeneráció



- A differenciálódott sejtek bizonyos körülmények között képesek visszanyerni totipotenciájukat, és akár egy teljes növényt kifejleszteni
- A gátlás alá került gének újra aktiválódnak, és a különböző szövetek, szervek létrehozásához szükséges enzimeket kezdik termelni, megindul az *in vitro* ontogenezis

Növény transzformáció főbb lépései



Explantumok izolálása és előkészítése

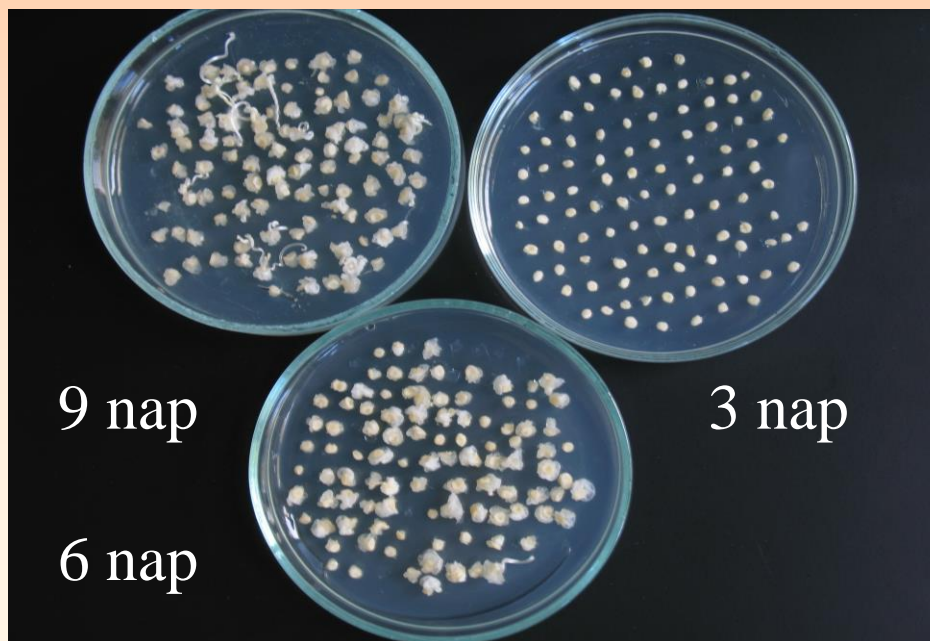
- Leggyakrabban használt explantumok:
Éretlen embrió (kora)
Érett embrió



izolálás



1-1,5 mm

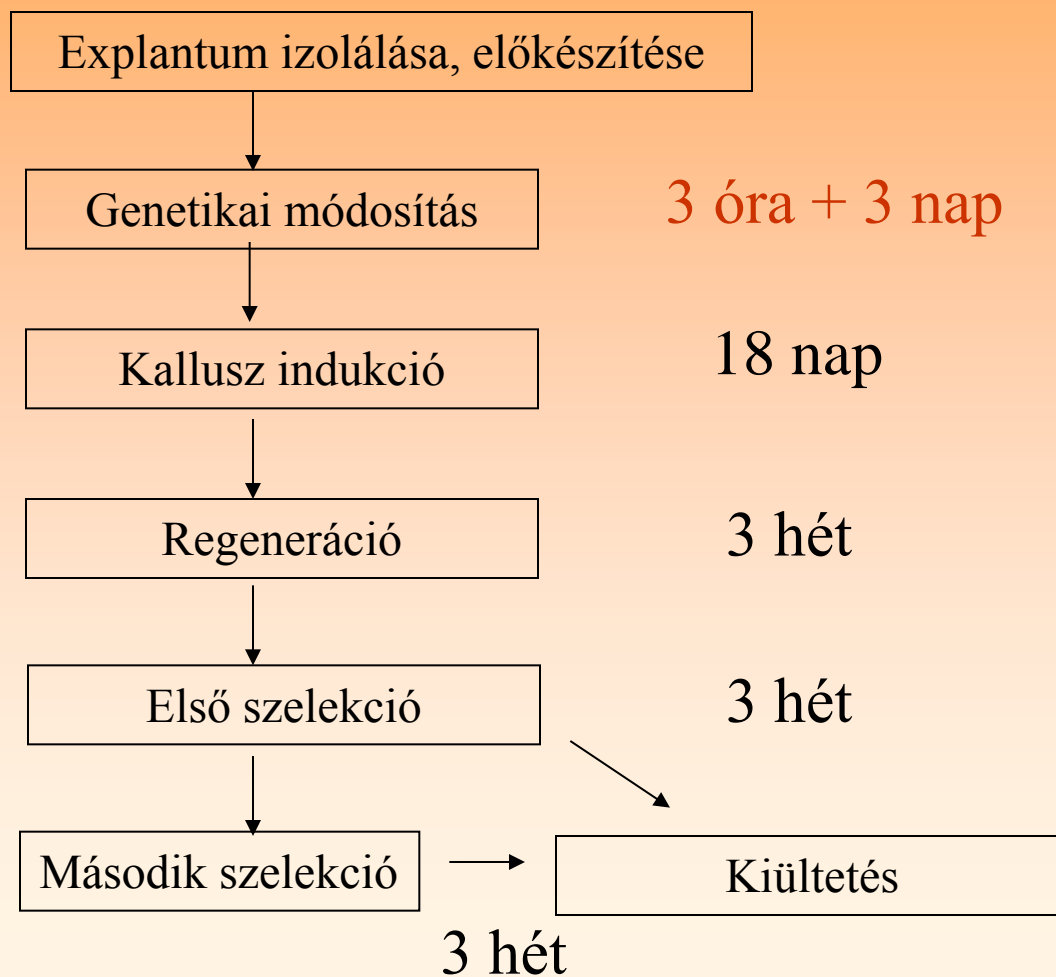


9 nap

6 nap

3 nap

Növény transzformáció főbb lépései



Tranziens génexpresszió

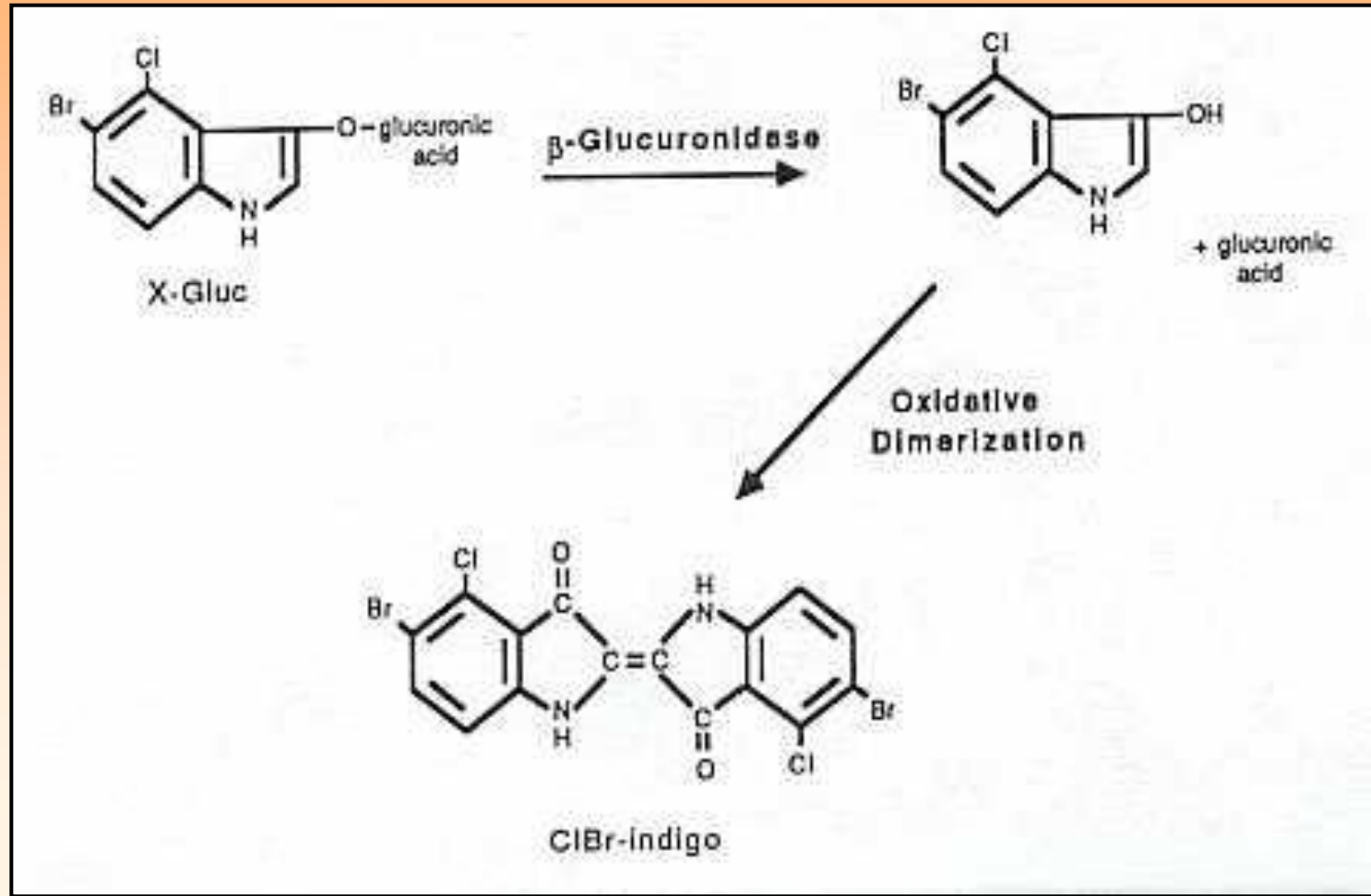
Riporter gén

- Könnyen kimutatható érzékeny módszer
- Kvantifikálható
- Nem letális

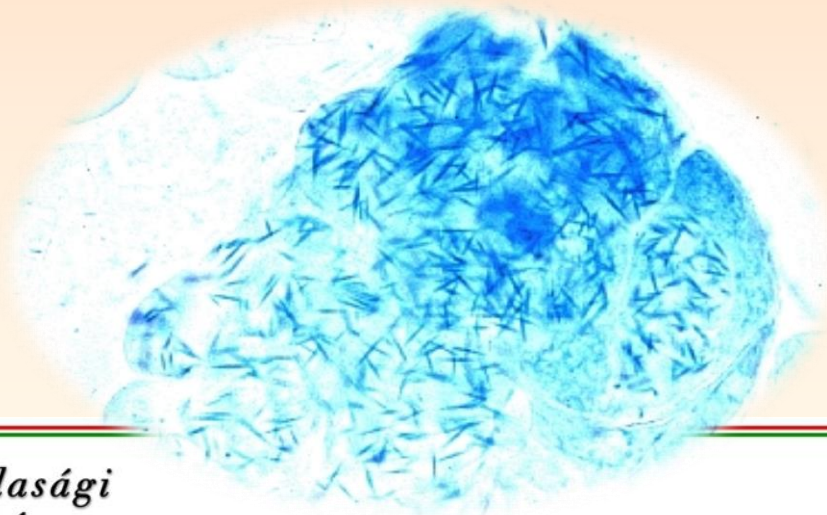
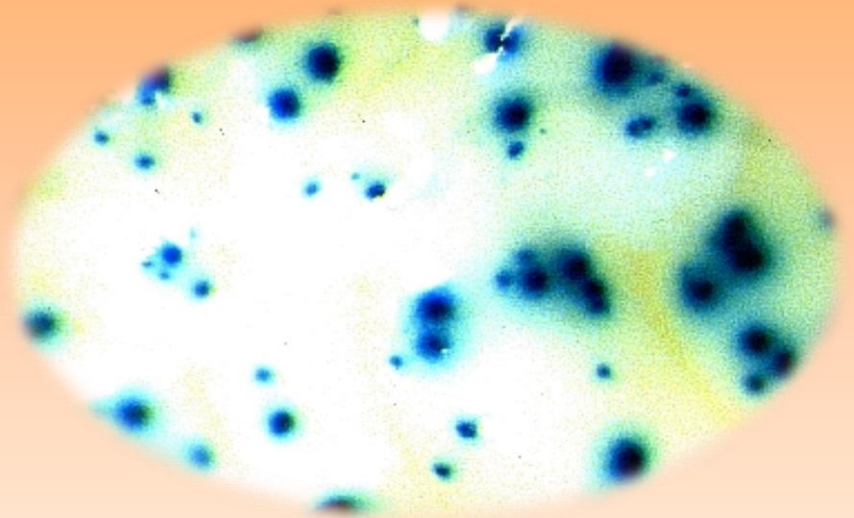
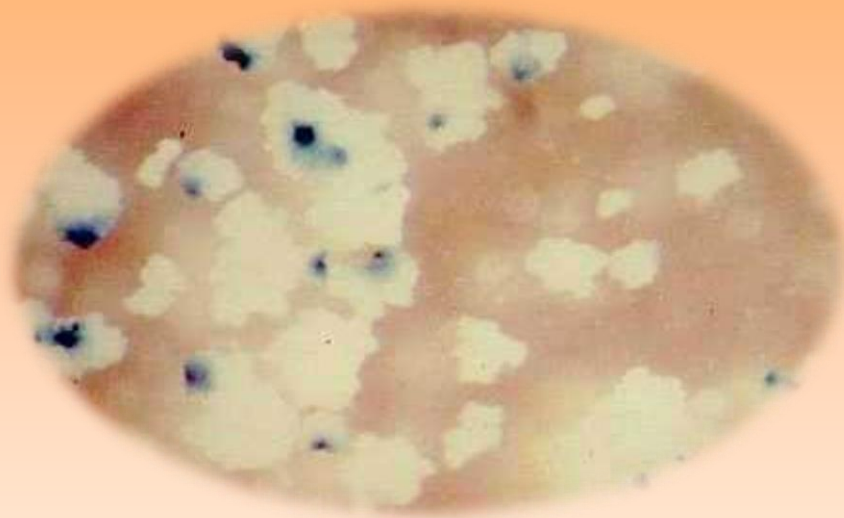
Leggyakrabban alkalmazott riporter gének

- β -glucuronidase (*uidA* or *gusA*)
- luciferaz (*luc/lux*)
- green fluorescent protein(s) (*gfp*)

Riporter gének *gusA*



Riporter gének *gusA*

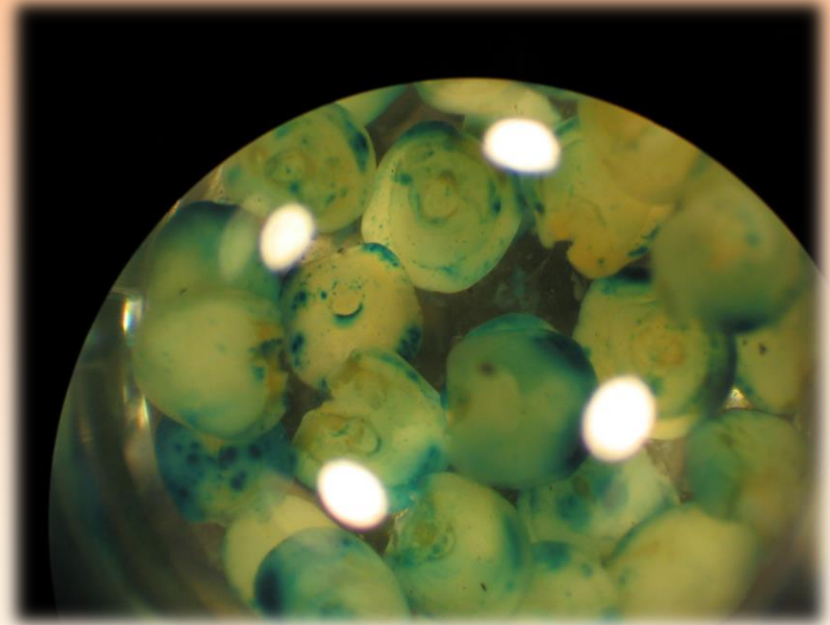


GUS festés

Kontroll



Transzformált embriók

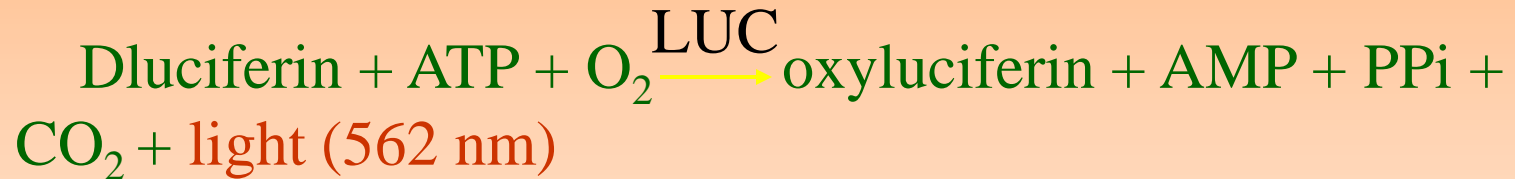




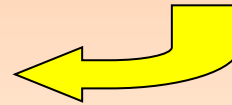
Riporter gének

Luciferáz

Photinus pyralis

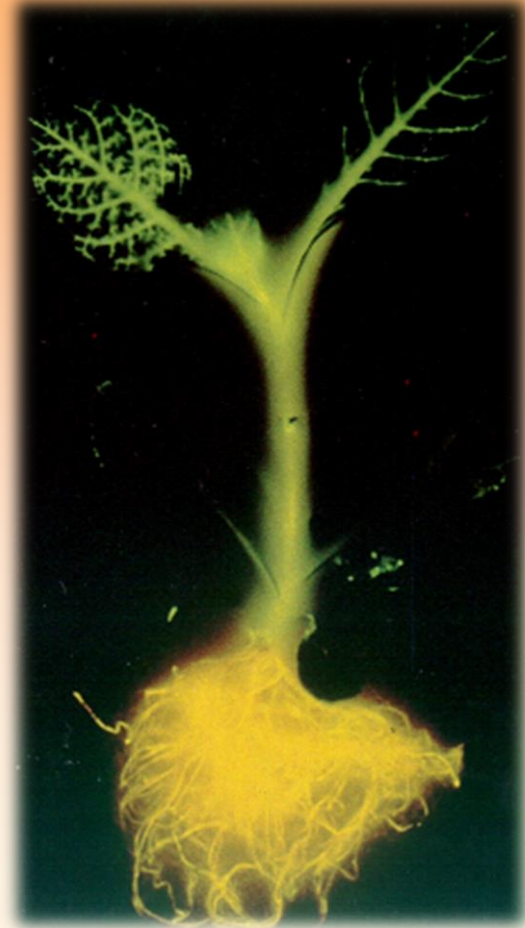


ultrasensitive digital
CCD camera system

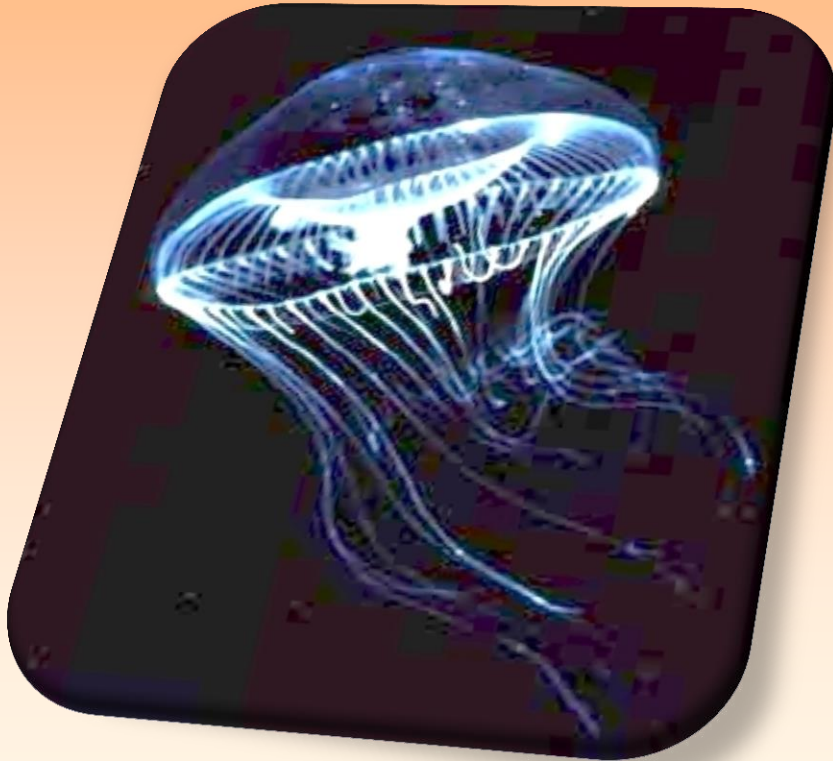


Riporter gének

luc



Riporter gének *gfp*



Aequorea victoria

Riporter gének

GFP



238 Apoaequorin - luciferin

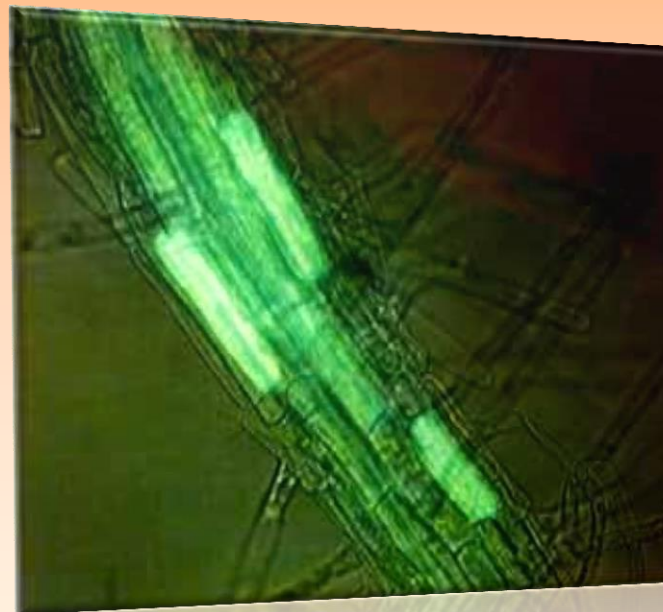
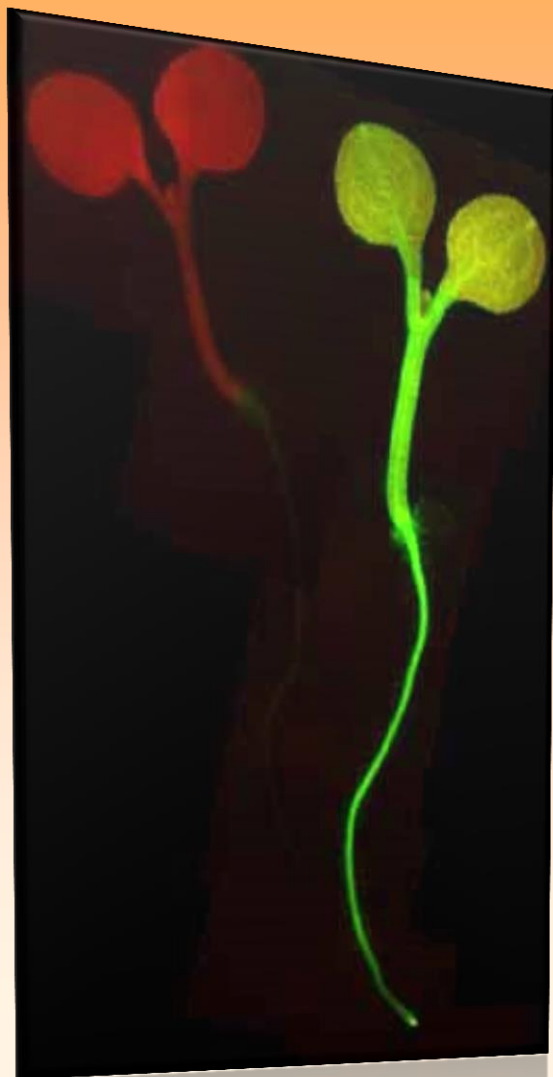
27 kDa monomer

pH 5.5 - 12.0

Temp. < 65 °C



Riporter gének GFP

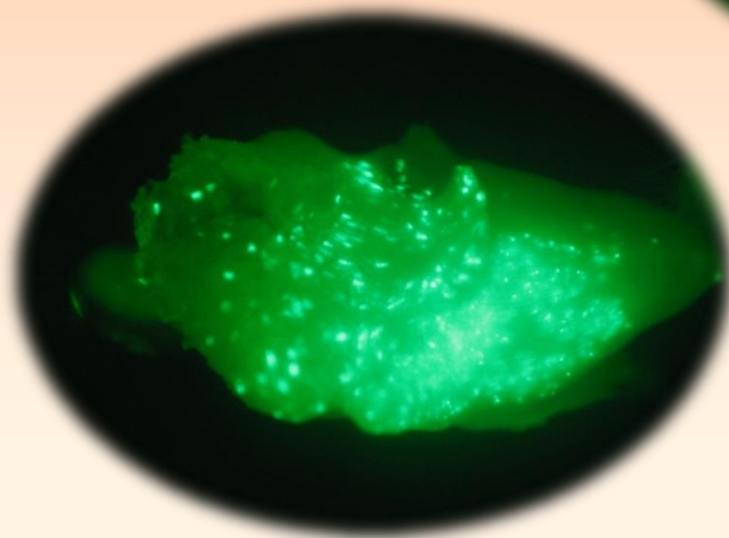
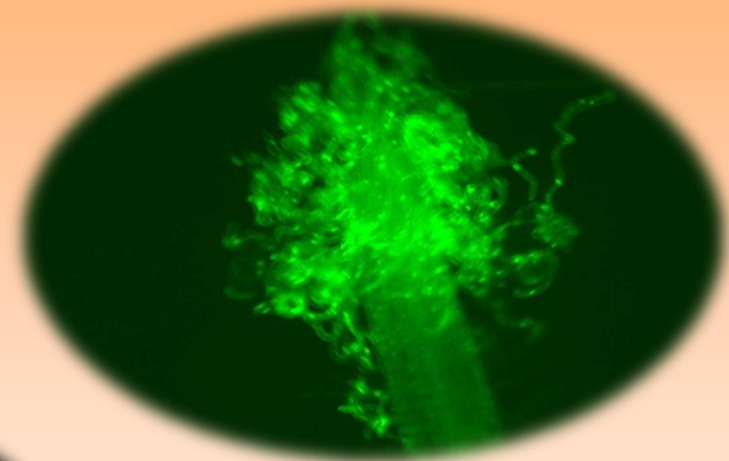


Arabidopsis

Riporter gének



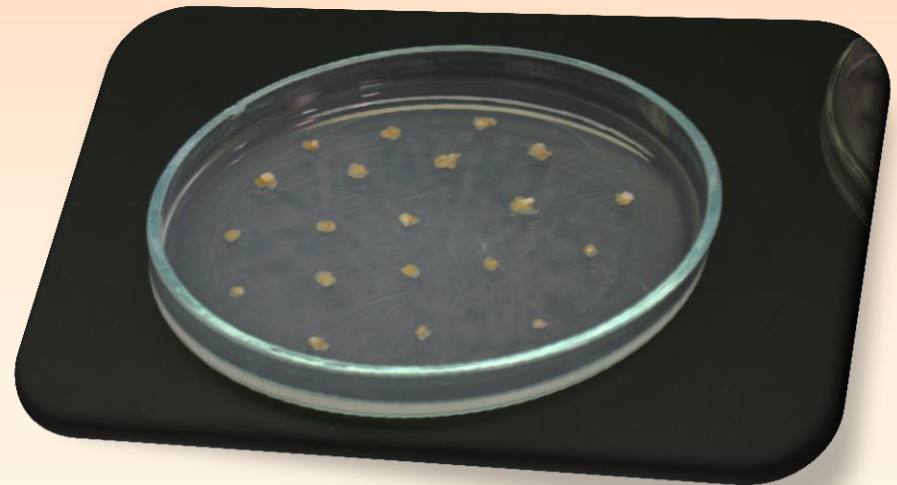
Control



Transgenic

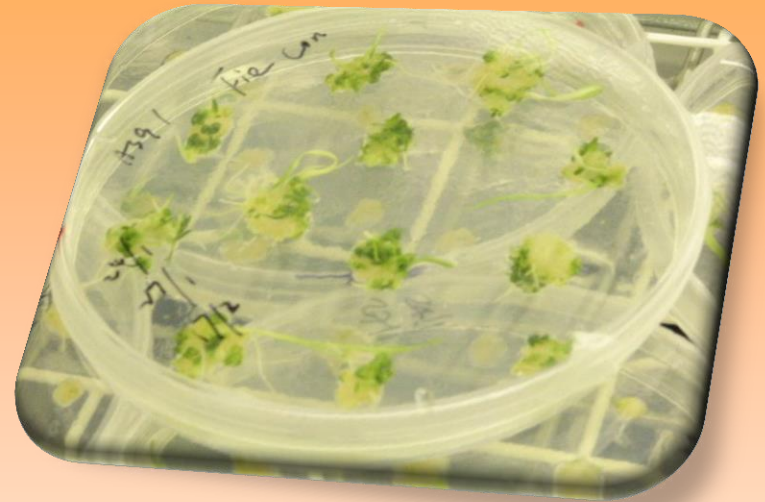
Kallusz indukció

- Antibiotikum (Timentin) alkalmazása az agrobaktérium előlésére
- Auxinok és citokininek
- Sötétben 20-30 °C-on
- 18-21 nap



Regeneráció

- Az embriogén kalluszokat regenerációs táptalajra helyezzük
- 2,4D-t tartalmaz
- Fényben 3 hétig



Szelekció

- Foszfinotricinnel (PPT) végezzük (2-4mg/l)



Integrálódott gén jelenlétének kimutatása - Szelekciós rendszer

Rezisztencia gének és funkcionális szelekciós gének

- Antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakítása (kanamycin, geneticin, hydromycin, etc.)
- Növényvédőszerrel (herbicide) szembeni rezisztencia kialakítása (bar vagy phosphinotricin acetyl transferase)
- Pozitív funkcionális szelekcióval metabolikus előny kialakítása



Leggyakrabban alkalmazott szelektív ágensek

Szelektív anyag	Hatásmechanizmus	Rezisztencia gén	Rezisztencia mechanizmus
I. Aminoglikozid típusú antibiotikumokkal			
higromicin,	Gátolja a peptidlánc hosszanti növekedését	<i>hpt</i> (higromicin-foszfotranszferáz)	Foszforilálással detoxikál
geneticin, kanamicin, neomicin, paromomicin	Gátolja az RNS transláció iniciálását	<i>nptII</i> (neomicin-foszfotranszferáz)	Foszforilálással detoxikál
II. Glufozinát-ammónium típusú herbicidekkel			
foszfinotricin/PPT/bialaphos	Gátolja a glutamin szintézist, ammónia felhalmozódást okoz	<i>bar</i>	Acetolálással detoxikál
III. Glifozát típusú herbicidekkel			
Roundup	Gátolja az aromás aminosavak szintézisét	<i>aroA:CP4</i> gén	EPSPS – 5-enol-piruvil-sikimisav-3-foszfát-szintáz) módosított változatát kódolja

Szelekciós gén mentes növények előállítása helyspecifikus rekombinációval Cre/Lox rendszer

Eserichia coli P1 bakteriofág

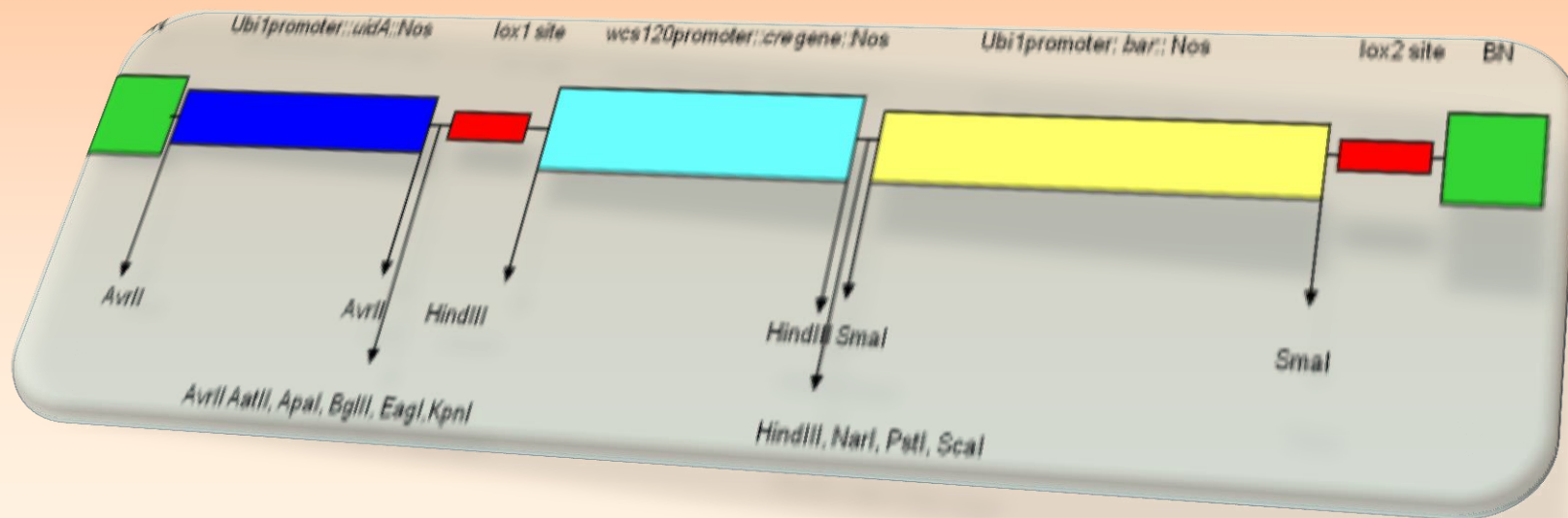
Cre rekombináz 38 kDa

loxP: 34bp

ATAACTTCGTATA ATGTATGC TATACGAAGTTAT

Szelekciós gén mentes növények előállítása helyspecifikus rekombinációval

Cre/Lox rendszer



Akklimatizálódás

- Üvegházban, vagy fóliaházban végezzük
- Kezdetben árnyékolás sűrű párasítás
- Végül steril tőzegbe ültetés



Növények genetikai transzformációja

Transzformációs technika:

Közvetlen:

A DNS-t közvetlenül juttatjuk be a befogadó szervezet sejtjeibe, mechanikai, kémiai vagy valamilyen erőter segítségével

Közvetett:

A DNS bejuttatása közvetítő organizmusok segítségével történik

Vektorok: riporter, szelekciós, hasznos, a beépüléshez és működéshez szükséges szekvenciák



Transzformálás
transzgenikus növény regenerálása

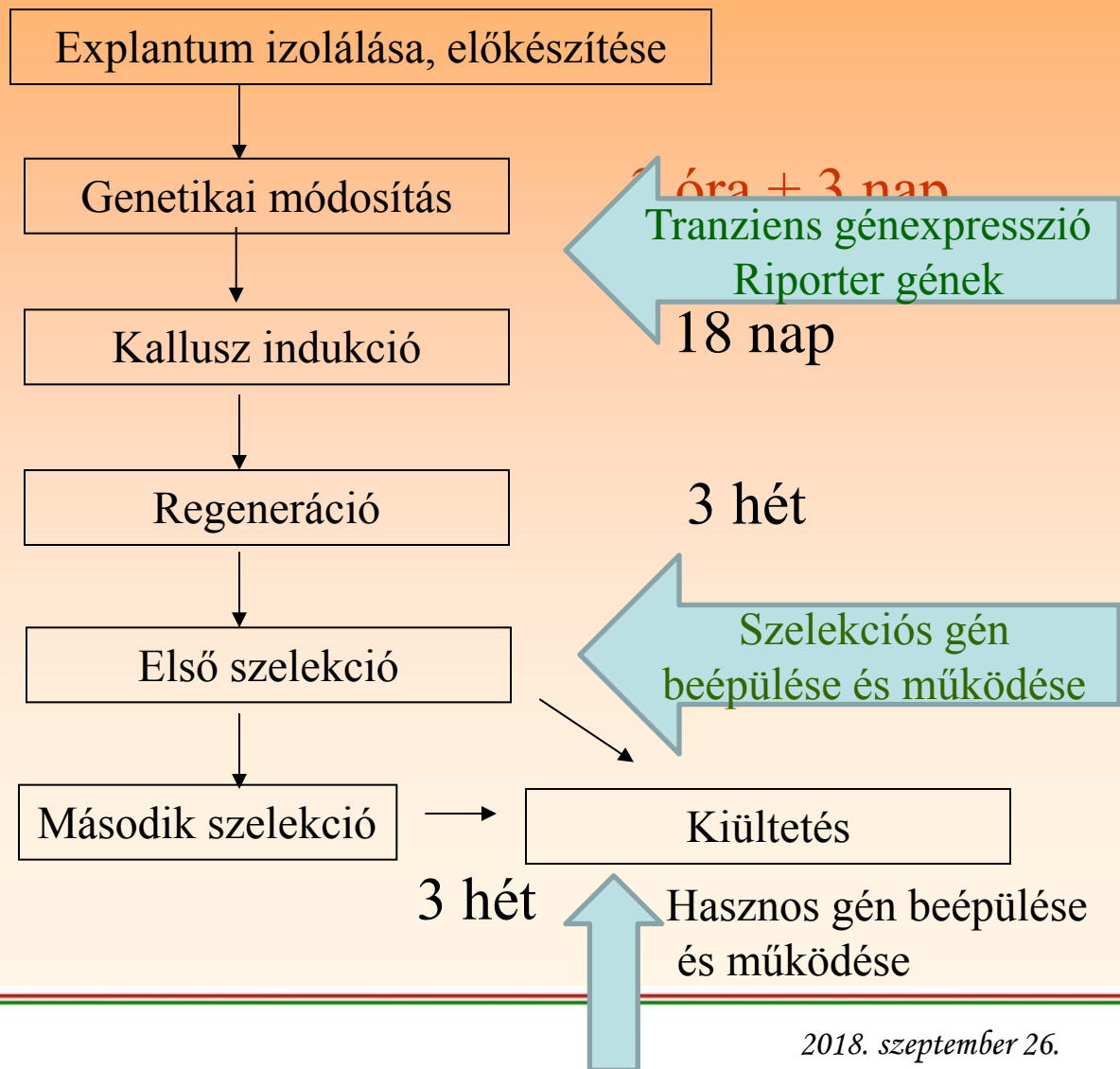
Transzgen beépülésének és működésének kimutatása
Transzgenikus növény felhasználása

Transzformálható fajták:

Célpont: sejt, protoplaszt, szövet, növény

Hatékony *in vitro* regenerációs rendszer

Növény transzformáció főbb lépései

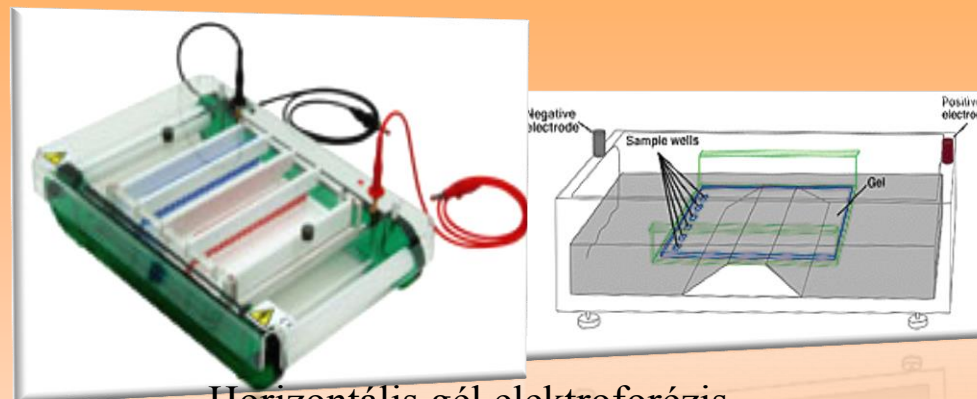


Transzgen kimutatása a transzformáció folyamatában

1. Tranziens génexpresszió kimutatása
2. Integrálódott gén jelenlétének kimutatása
3. A beépült kópiaszám meghatározása
4. A gén által expresszált termék jelenlétének és mennyiségének detektálása, mérése
5. A génbeépülés helyének meghatározása

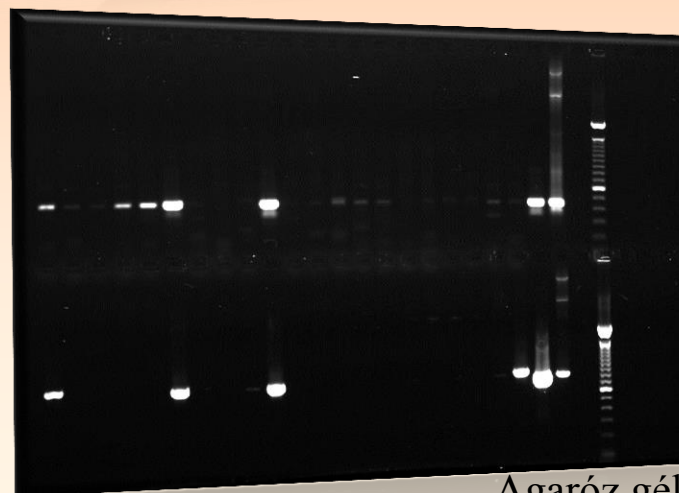
PCR (polymerase chain reaction)

PCR készülék



Horizontális gél elektroforézis

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 C- C+ C+



BAR 420 bp

Pm3 824 bp

Agaróz gélelektroforézis

EtBr festés

Beépült kópiaszám/relatív mennyiség meghatározása

RT-PCR (real-time/kinetic)

A DNS azonosításán túl mennyiségi értékelést tesz lehetővé (abszolút (pl. kópiaszám) vagy relatív mennyiség), detektálás fluoreszcenz festéssel vagy jelölt primerekkel

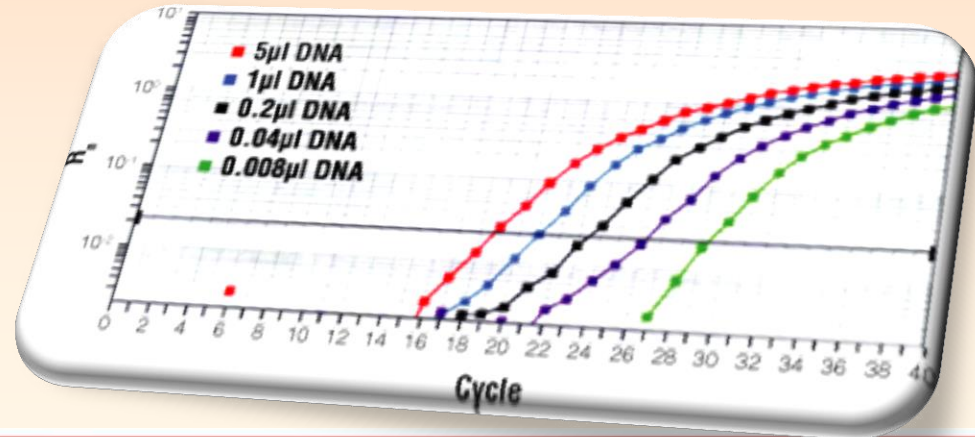
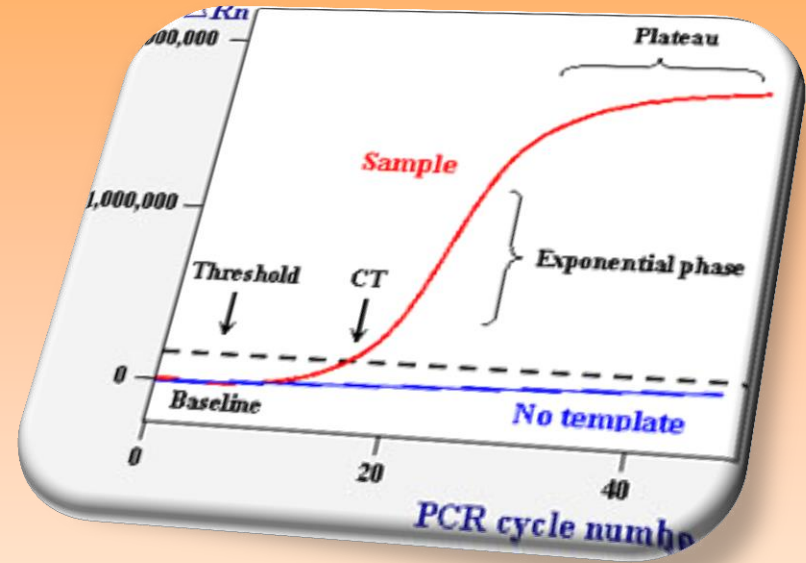
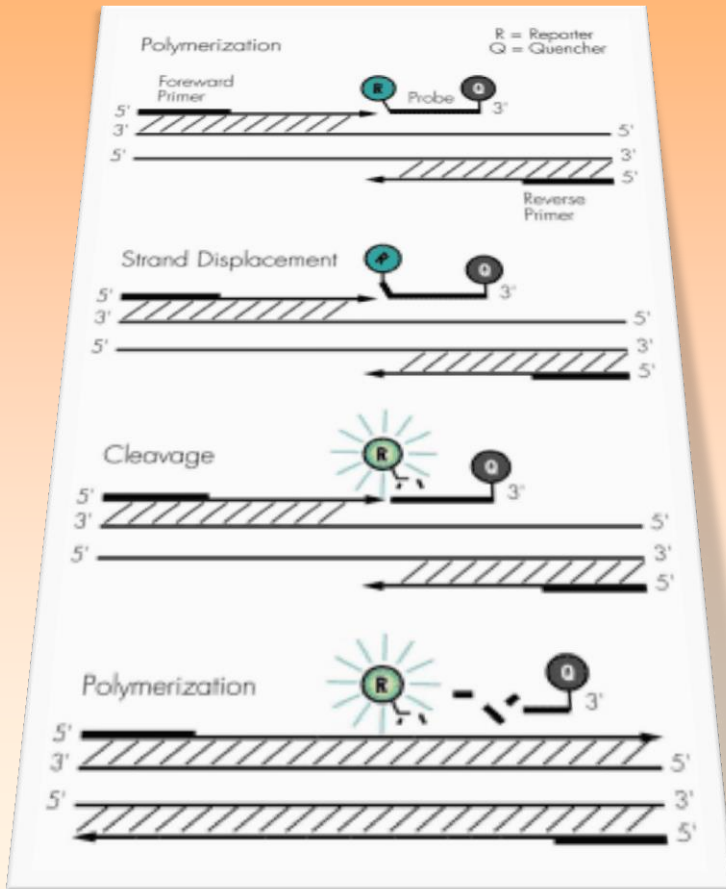
Sejtek, szövetek mRNS tartalmát is képes meghatározni reverz transzkriptáz enzim felhasználásával

† Fluoreszcenz riporter próba (TaqMan) - pontos, a nem specifikus DNS darabokat nem veszi figyelembe, nem erősítik a fluoreszcenciát

Fluoreszcenz riporter próba



RT-PCR



T

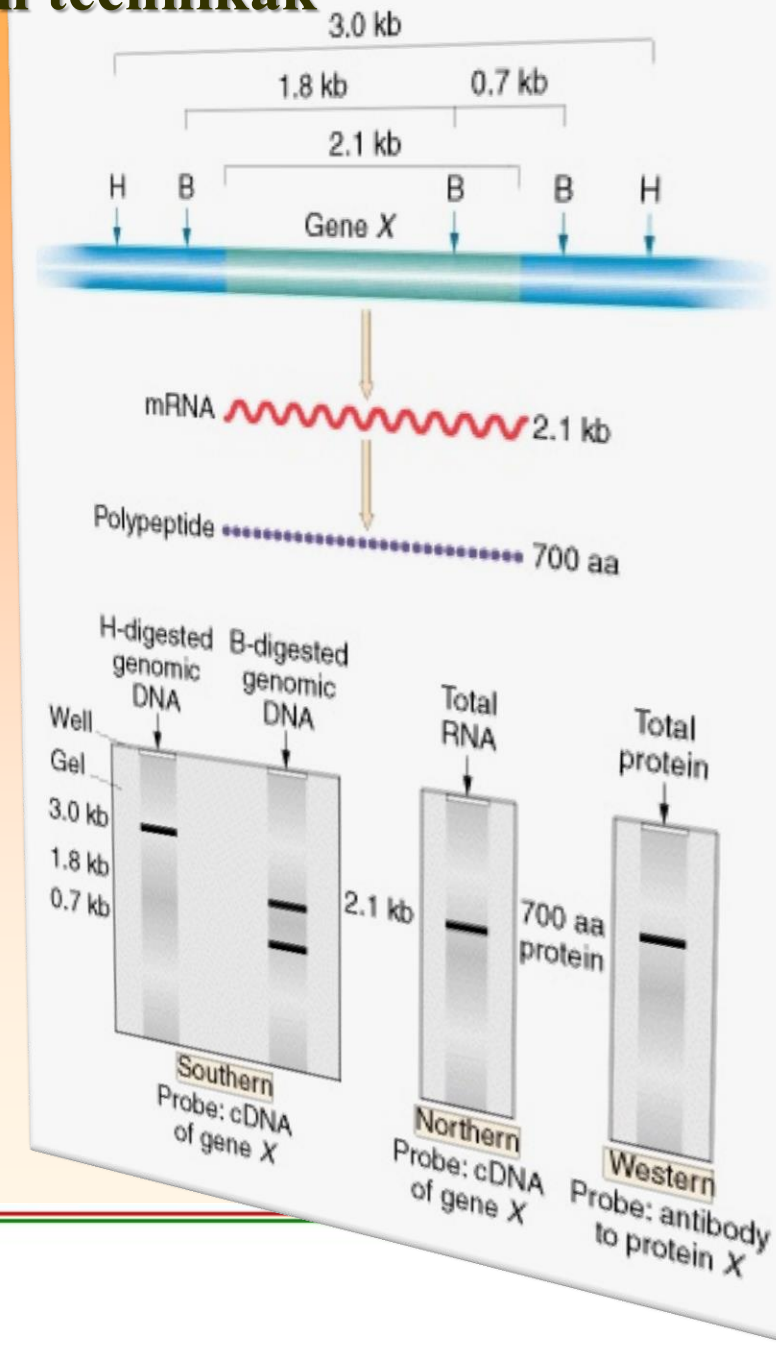
A Southern, Northern és Western technikák

Elektroforézissel a DNS, RNS vagy fehérje molekulák méret szerint elválaszthatók.

A gélben elválasztott molekulák filterre blottolhatók.

T A filteren hibridizációval azonosíthatók a próbával homológ fragmentek, ellenanyag festéssel pedig a kérdéses fehérje.

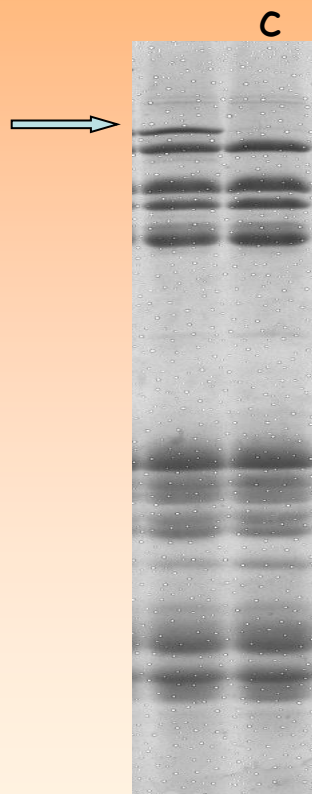
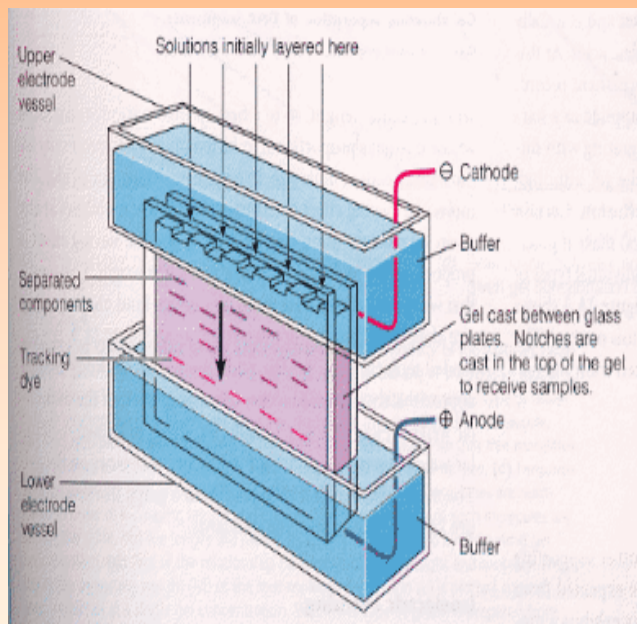
Southern-nel a gén DNS-e, Northern-nel a gén RNS-szinten történő kifejeződése, Western-nel a fehérje kifejeződése vizsgálható.



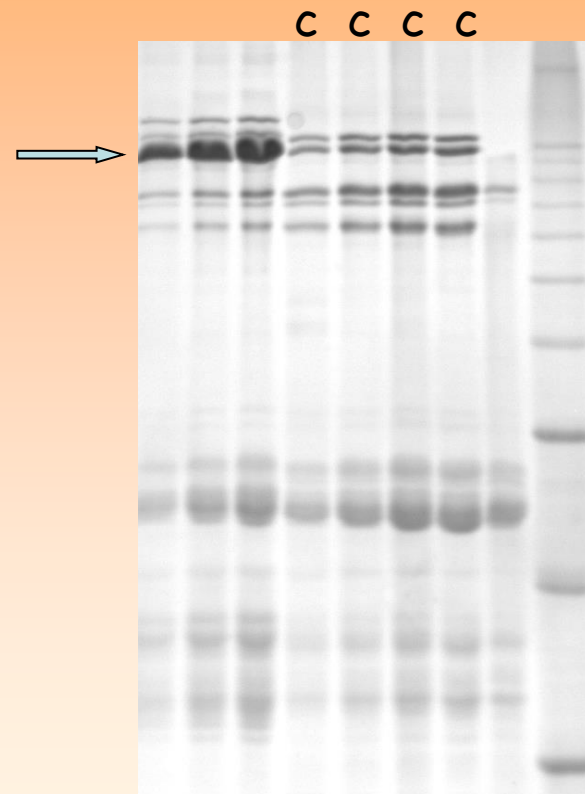
A gén által expresszált termék kimutatása

Fehérje kimutatás biokémiai markerekkel

SDS-PAGE



HMW glutenin fehérje
alegység expressziójának
bizonyítása



HMW glutenin alegység
magnövekedett
mennyiségének kimutatása

T

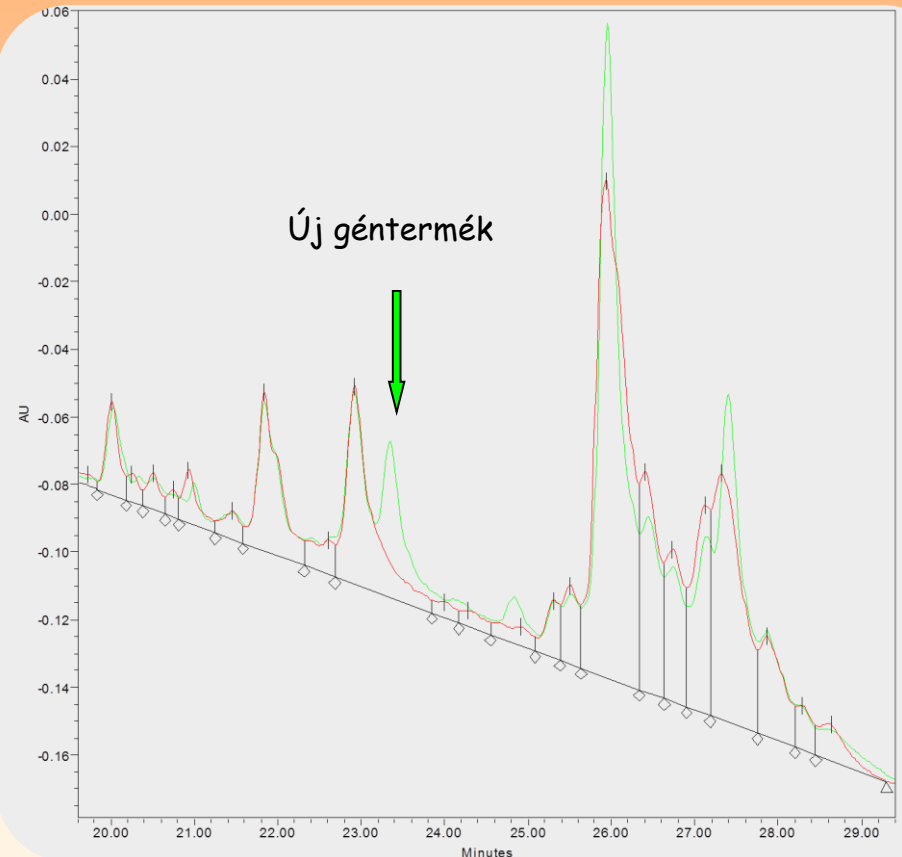
Expresszált termék jelenlétének és/vagy megnövekedett mennyiségének kimutatása

Mennyiségi értékelést tesz lehetővé



HPLC - nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia

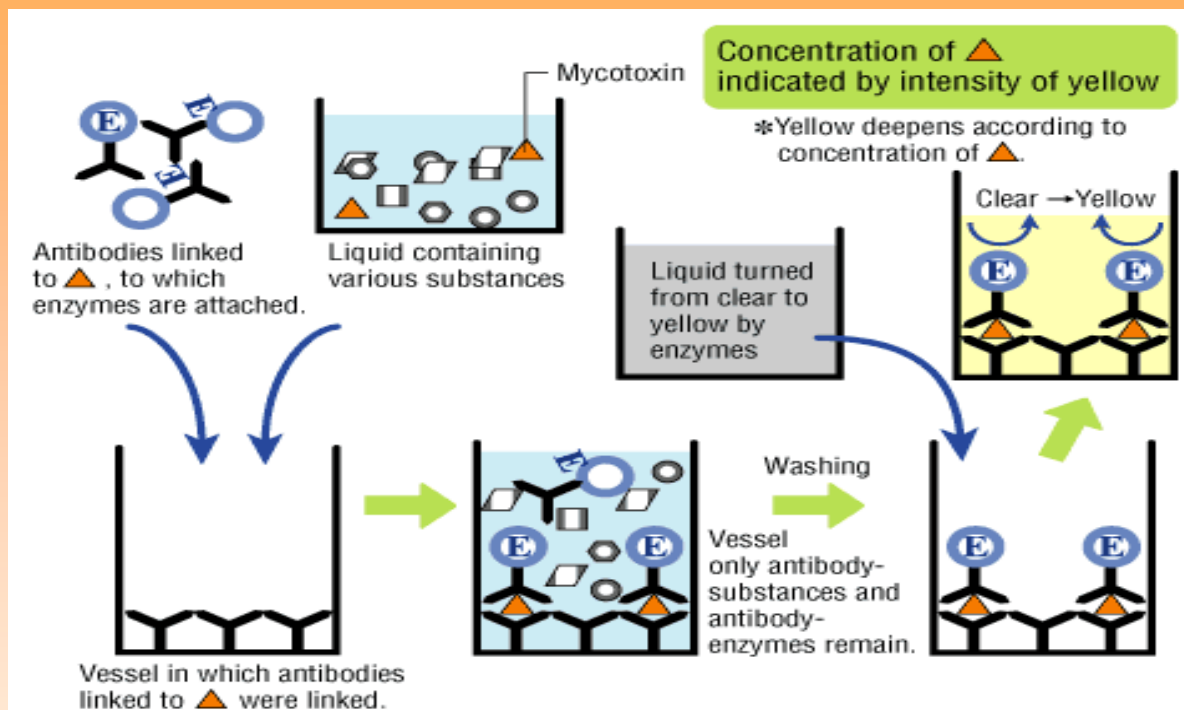
Megnövekedett mennyiség



Búza tartalékfehérjék elválasztása RP-HPLC módszerrel

T

ELISA (enzyme linked immunosolvent assay)



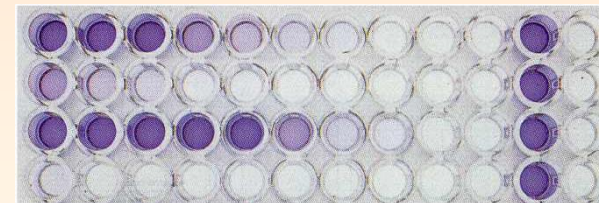
Antigén vagy antitest jelenlétének megállapítása +/-

Élelmiszer allergének kimutatása +/-

Drog jelenlétének azonosítása +/-

Mennyiségi értékelés ismert koncentrációjú standard oldatokkal

Spektrofotometriás vagy fluoreszcenz detektálás



A génbeépülés helyének meghatározása

Térképező populáció előállítása

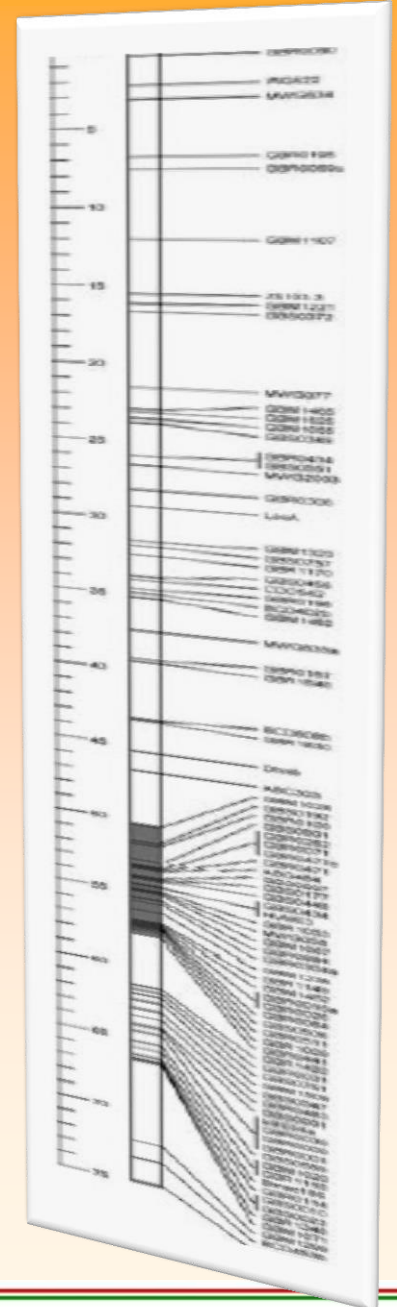
Transzformált növény x nem transzformált kontroll növény

Mikroszatellit és EST primerek alkalmazásával

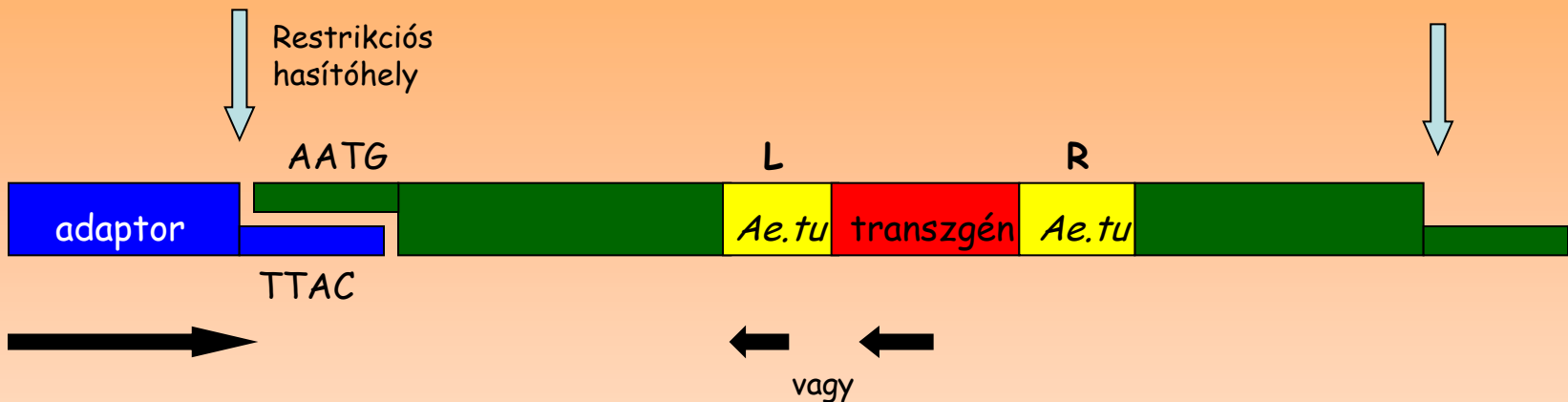
Genome walking

Rolling cycle

FiberFISH

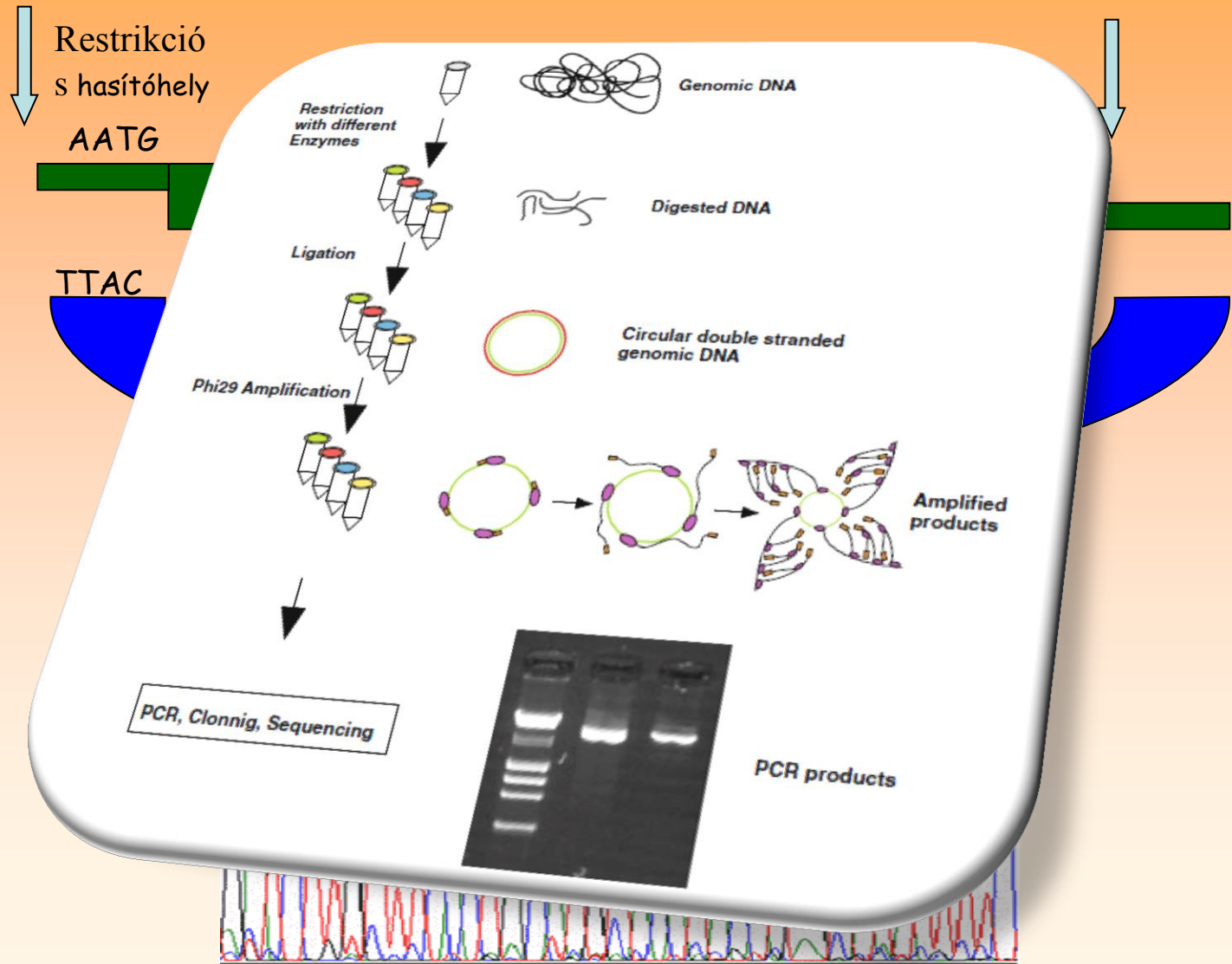


Genome walking



- DNS hasítása restriktációs enzimekkel (kb. 4 db)
- Hasításnál 'ragadós végek' keletkeznek (P csoport)
- Adaptor ligálása
- Primer tervezése adaptorra és az ismert szekvenciájú transzgénre vagy a gazda szervezet DNS-ére

Rolling cycle



T

Fiber-FISH

Fluorescence *in situ* hybridization to DNA fibers

Próba DNS
(Árpa,
Ae. biuncialis)

Az *in situ* hibridizáció alkalmas arra, hogy nukleinsav (RNS vagy DNS) szekvenciákat azonosítsunk a citoplazmában, a kromoszómákon, sejtalkotókban



Izolálás



Fragmentálás



Jelölés (direkt, indirekt)

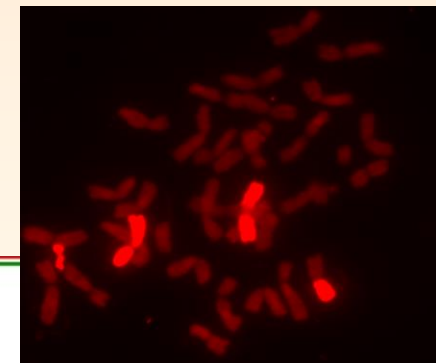


A kromoszóma és a próba DNS denaturálása

Hibridizálás

A nem homológ DNS szekvenciák lemosása

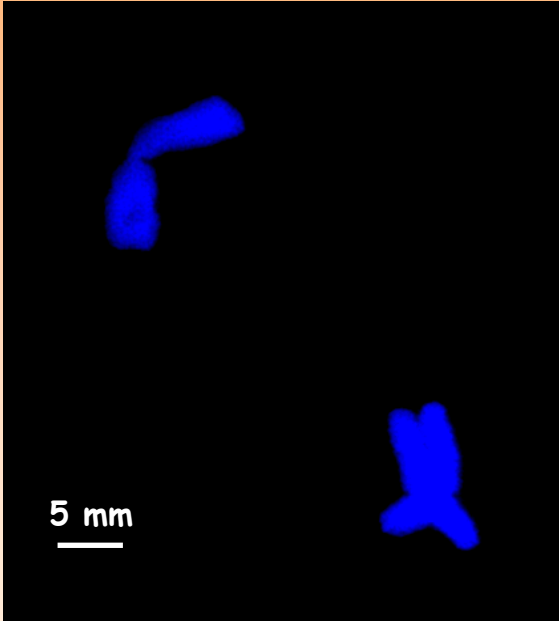
Detektálás, kontrasztfestés



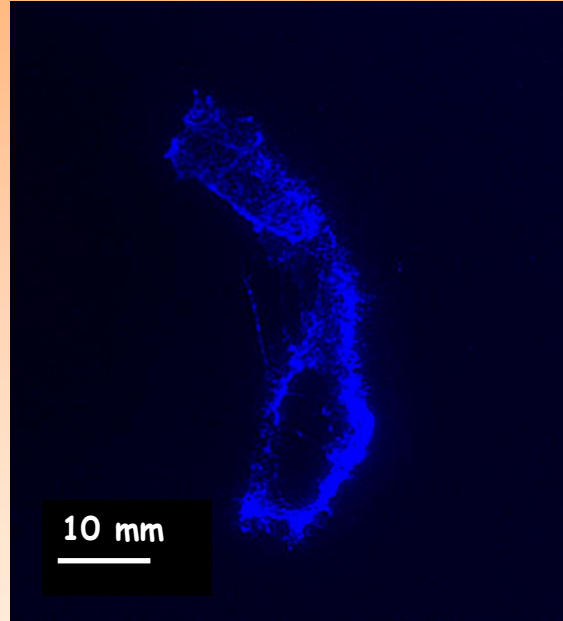
T

DNS szál preparálása kromoszómákból

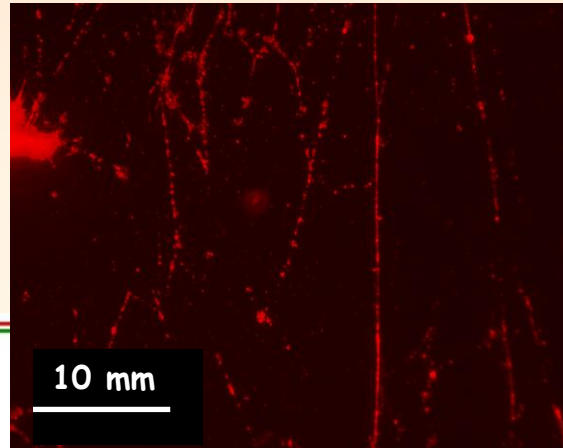
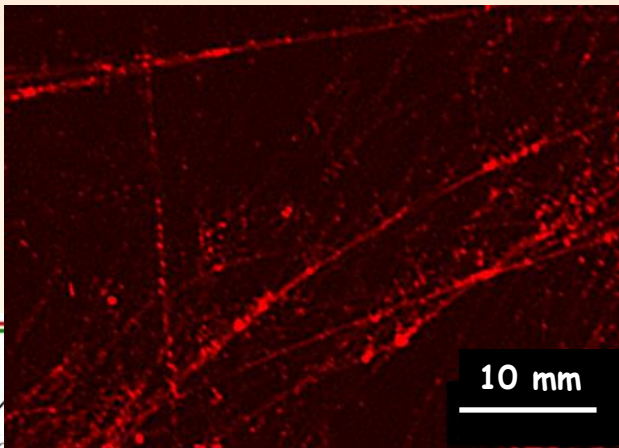
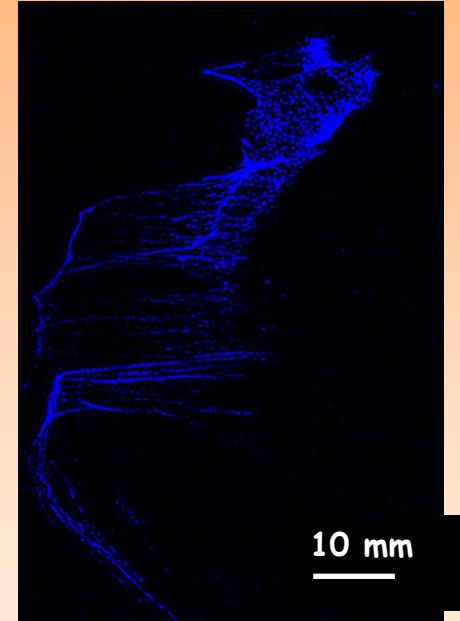
Emésztetlen kromoszómák



Emésztett kromoszóma
(8 min, 65 °C, 180 mg mL⁻¹ Proteinase-K)



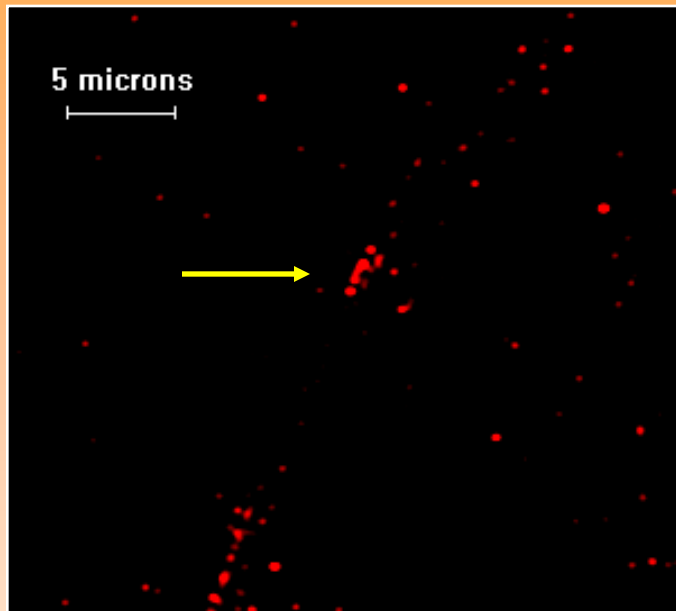
Emésztett kromoszóma
mechanikai nyújtás után



← Fixált DNS preparátum

2018. szeptember 26.
Mészáros Ksára

Alacsony kópiaszámú szekvenciák kimutatása DNS szálakon



Kísérleti növény: *Triticum aestivum*,
cv. Mv Suba, cv. Mv Gorsium

Preparátum: 2000 kromoszóma, 1D, 4D,
6D

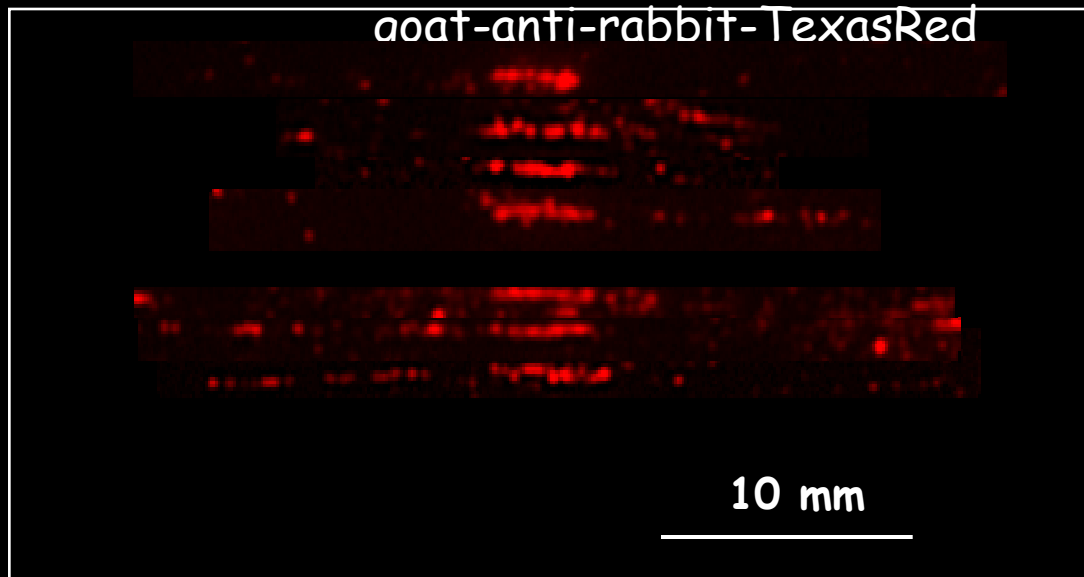
Próba: pHMW1Dx5 plasmid, insert 8,7 kb
insert + vector: 11,386 kb

Jelölés: nick-transzláció, Dig-11-dUTP

Detektálás: sheep-anti-Dig-Rhodamine,
rabbit-anti-sheep-TexasRed

Elméletileg $2,9 \text{ kb mm}^{-1}$

	Szignál hossz (mm)	
	Elmélet i	Kapott
Insert (8,7 kb)	3	$2,11 \pm 0,65$
Insert+vector (11,386 kb)	3,92	$4,07 \pm 0,55$



Rutin módszerek kifejlesztése és alkalmazása



ELISA

Tesztelt növények

Búza

Rizs

Kukorica

Gyapot

Cukorrépa

Kanola

Alfalfa

Gének

CP4 EPSPS -RoundupR

PAT/*pat* - herbicid

Cry1Ac -Bt

Cry1Ab

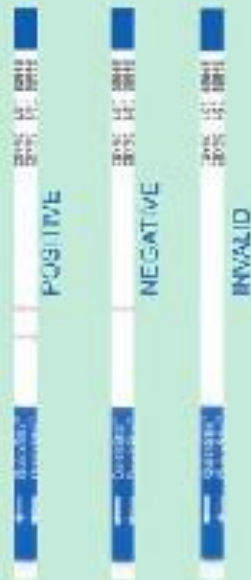
Cry2Ac

Cry1F

stb

Módszerek

ELISA plate
Gyorsteszt csík



PCR

Promóter/ terminátor régió kimutatása PCR módszerrel



GMO kimutatási módszerek validálása

Több labor részvételével standardizálják a kimutatási technikát

Íly módon validált módszerek:

Például:

1. CaMv 35S promóter/NOS terminátor kimutatása szójababban és kukoricában PCR módszerrel
2. ELISA módszer Roundup Ready szója kimutatására (Antigén: EPSPS gén fehérjeterméke)

Problémák

Mintavétel - Az alapanyag keverten tartalmaz GMO és GMO mentes tételeket, megfelelő mintavétel, keverés, leőrölve újrakeverés

PCR

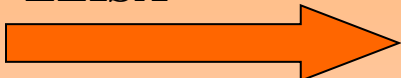
- hamis pozitív vagy negatív eredmény
- A DNS oldat tartalmazhat inhibitort, mely gátolja a PCR reakciót
- Kimutatási határ - 0.1% GMO mennyiséget képes kimutatni nyersanyagban, de feldolgozott formában 1% a kimutatás érzékenysége (durum esetén 3%) Min. 2% GMO jelenléte általában megbízhatóan kimutatható nyersanyagokban
- alapanyag feldolgozottsága

ELISA

- gyors, egyszerű, olcsóbb, de termékek vizsgálatára nem alkalmas

Módszerek alkalmazhatósága alapanyagtól függően

ELISA



STANDARD PCR



AUTOMATIZÁLT PCR pl. TaqMan



MAG

NYERSANYAG

**RÉSZBENI
FELDOLGOZÁSSAL
KAPOTT TERMÉK**

**TELJES
FELDOLGOZÁS
UTÁNI TERMÉK**

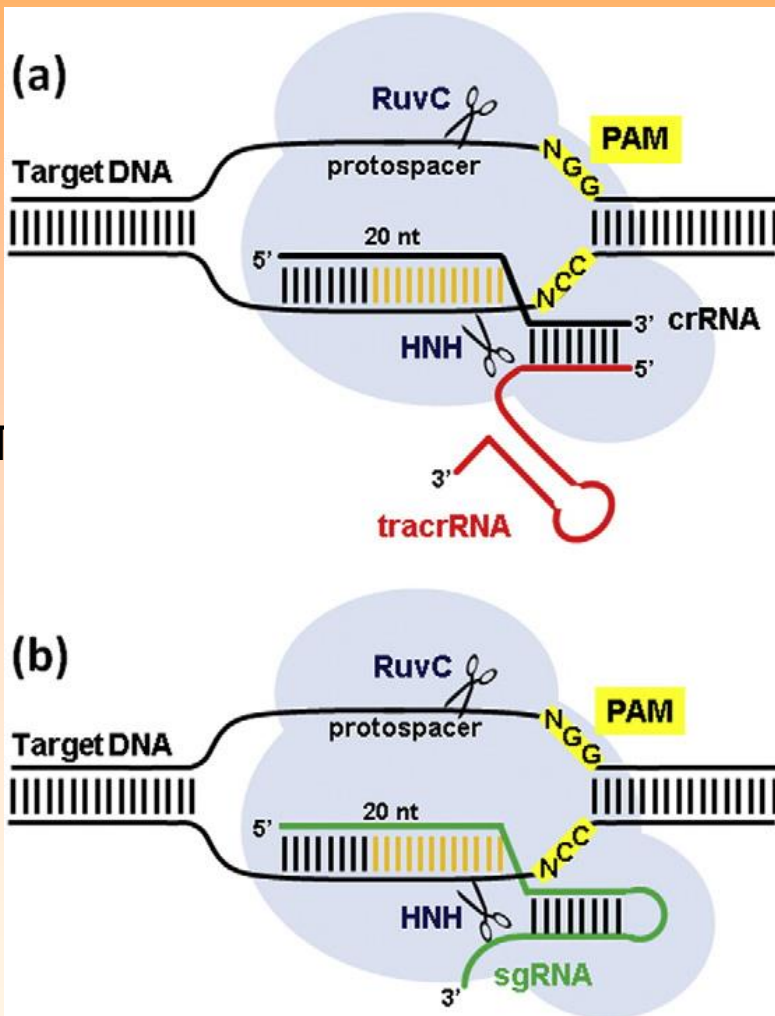
Genom szerkesztés

A genomszerkesztéssel olyan módszerek kerültek a kezünkbe, amelyekkel tetszés szerint, a korábbiaknál jóval pontosabban módosíthatjuk egy élőlény genetikai állományát

T A CRISPR-Cas a bakteriális immunrendszer része, amely védelmet biztosít a vírusfertőzések vagy bármilyen idegen eredetű DNS vagy RNS (pl. [konjugáció](#) vagy [transzformáció](#)) ellen

A CRISPR rendszer alkalmas arra, hogy sejten belül konkrét helyeken mutációkat hozzanak létre a genomban.

CRISPR/Cas részei



Komponens Feladat

crRNS

ez az RNS-szakasz tartalmazza a célszekvenciát (amelyet az enzim elvág majd a sejt kromoszómáján) és egy olyan régiót, ami megköti a transzaktivátor crRNS-t.

tracrRNS

transzaktivátor crRNS, amely a crRNS-hez kötődve aktív komplexet alkot

sgRNS

ha több gént is módosítani kívánnak, azok crRNS-ét egy tracrRNS-sel együtt egy nagy, közös RNS-ben lehet elhelyezni (*single guide*)

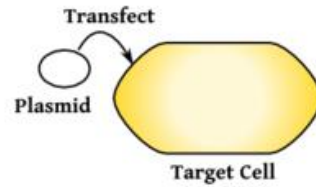
Cas9

a DNS-vágó enzim. Több formája is ismert, van amelyik a DNS csak egyik, van amelyik mindkét szálát elvágja a felismert régióon belül.

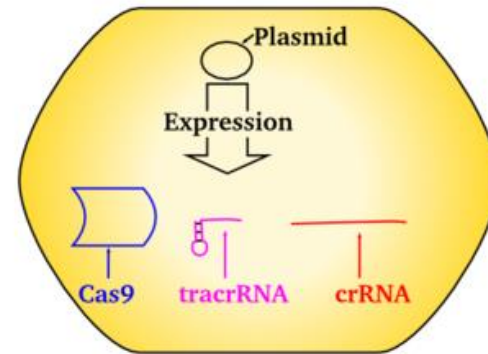
javítótemplát

olyan DNS-szakasz, amely mintát mutat a sejt javítóenzimeinek és amelyik szekvenciája beépül az enzim által elvágott helyre

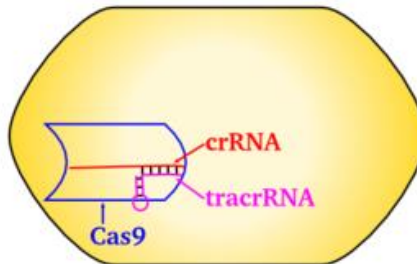
1: Transfection



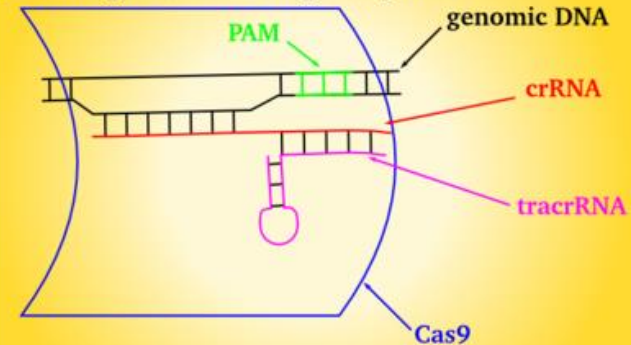
2: Expression of Plasmid



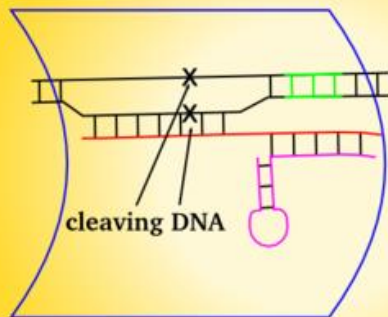
3: Activation of Cas9



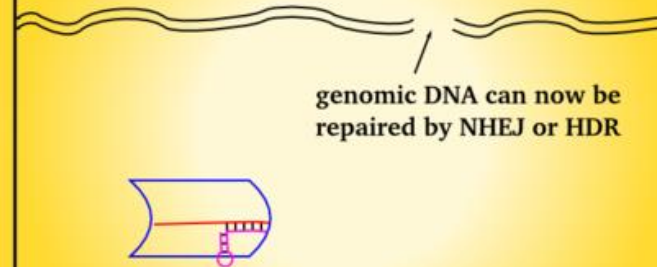
4: Binding to Genome Target Sequence



5: Cleaving Genomic DNA

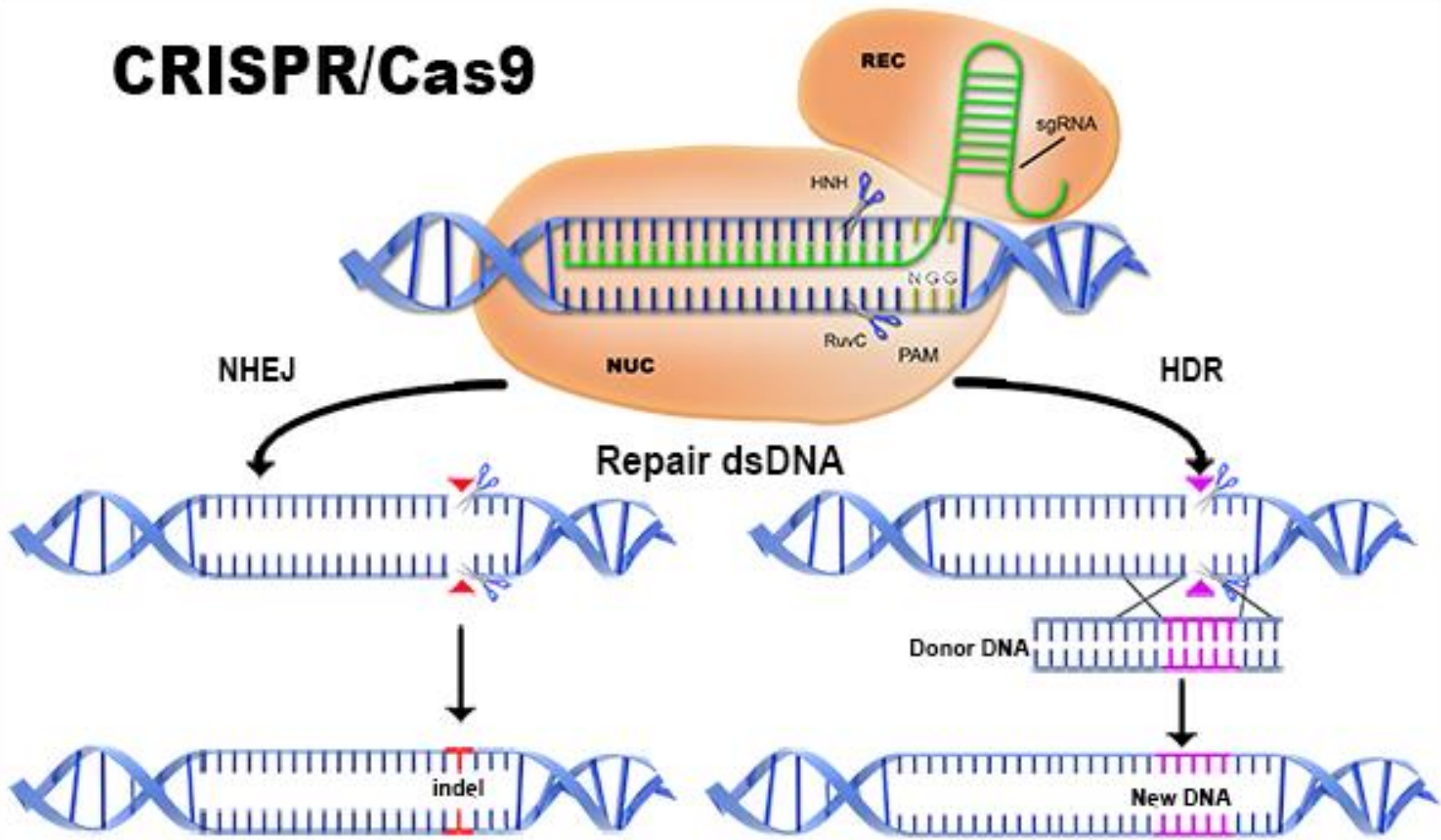


6: DNA is now ready for repair



T

CRISPR/Cas9



T



Köszönöm a figyelmet!