

# Transzgénikus növények előállítása

Mészáros Klára  
[meszarosk@agrar.mta.hu](mailto:meszarosk@agrar.mta.hu)

# Növények genetikai transzformációja

Transzformációs technika:

**Közvetlen:**

A DNS-t közvetlenül juttatjuk be a befogadó szervezet sejtjeibe

**Közvetett:**

A DNS bejuttatása közvetítő organizmusok segítségével történik

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



Transzformálás  
transzgénikus növény regenerálása

Transzgén beépülésének és működésének kimutatása  
Transzgénikus növény felhasználása

Transzformálható fajták:

Célpont: sejt, protoplaszt, szövet, növény

Hatékony *in vitro* regenerációs rendszer

# *Definíció*

**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 fajból 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

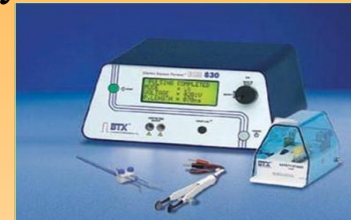
## Elektroporáció

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



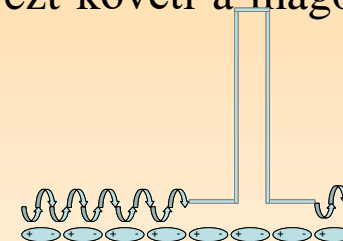
## Elektrofúzió

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 mikrométerű 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

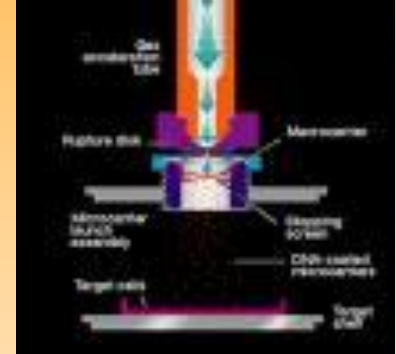
## **Mikroinjektálás**

- 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  $\mu\text{m}$  átmérőjű arany vagy wolfrám részecskére rögzítik (mikrokarrier)
- Ezeket a részecskéket nagy sebességre felgyorsítják, nagynyomású He vagy  $\text{N}_2$  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  $\mu\text{m}$ )  
és mennyisége (29-235  $\mu\text{g}$ /lövés)

➤ A mirohordozóra vitt oldat  
összetétele

2.5-20  $\mu\text{g}$  plazmid vagy

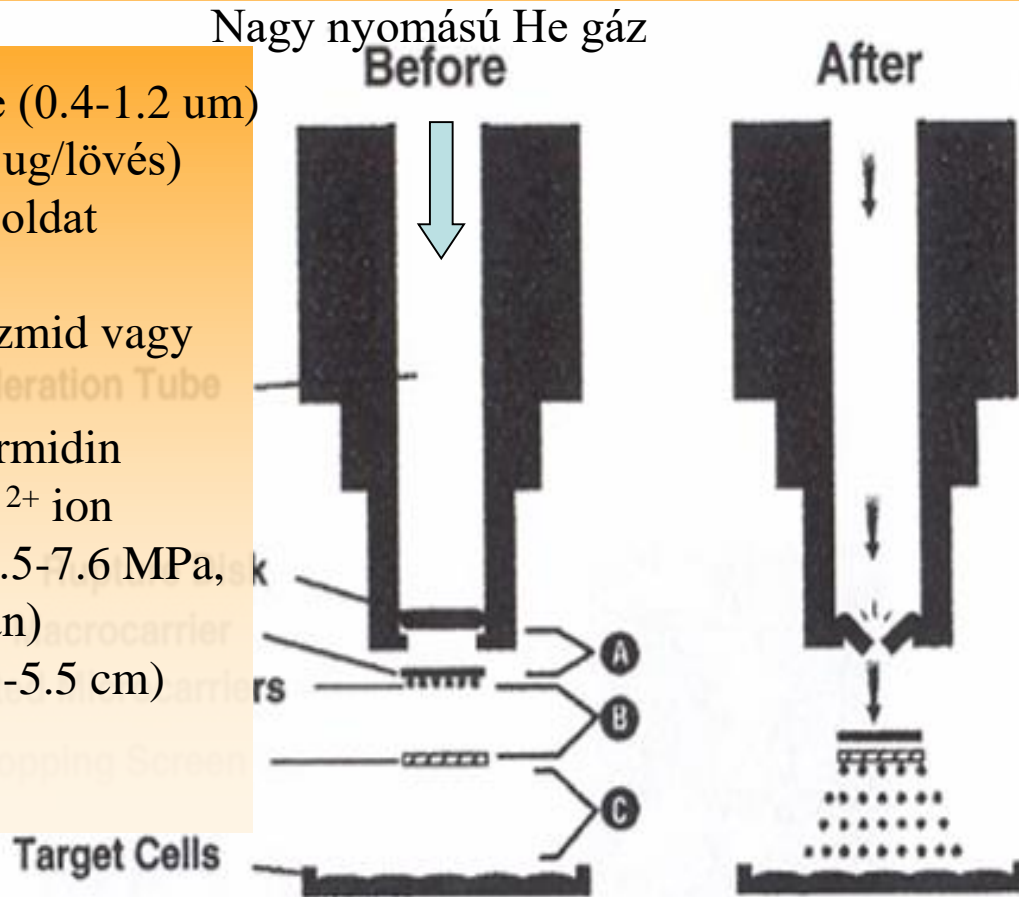
lineáris DNS

8-16 mM spermidin

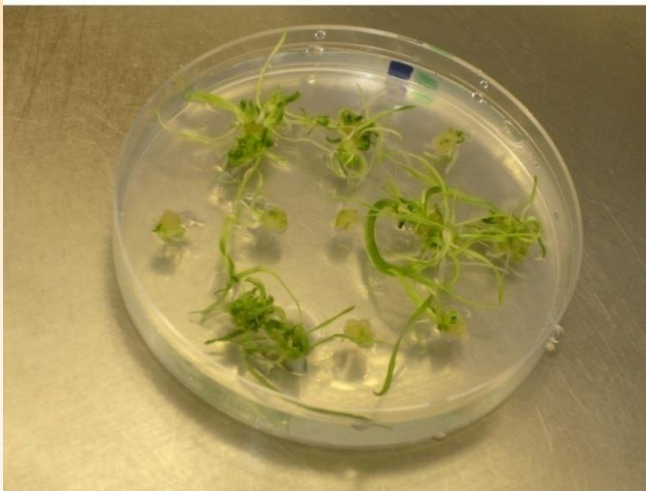
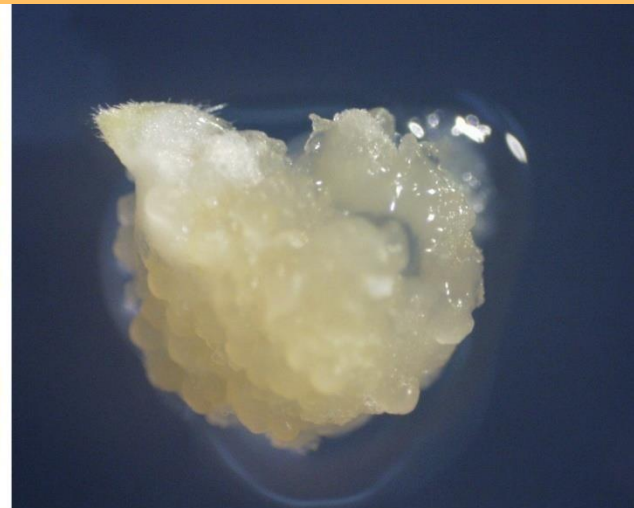
0.2-1.9 M  $\text{Ca}^{2+}$  ion

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

➤ A lövési távolság (2.5-5.5 cm)



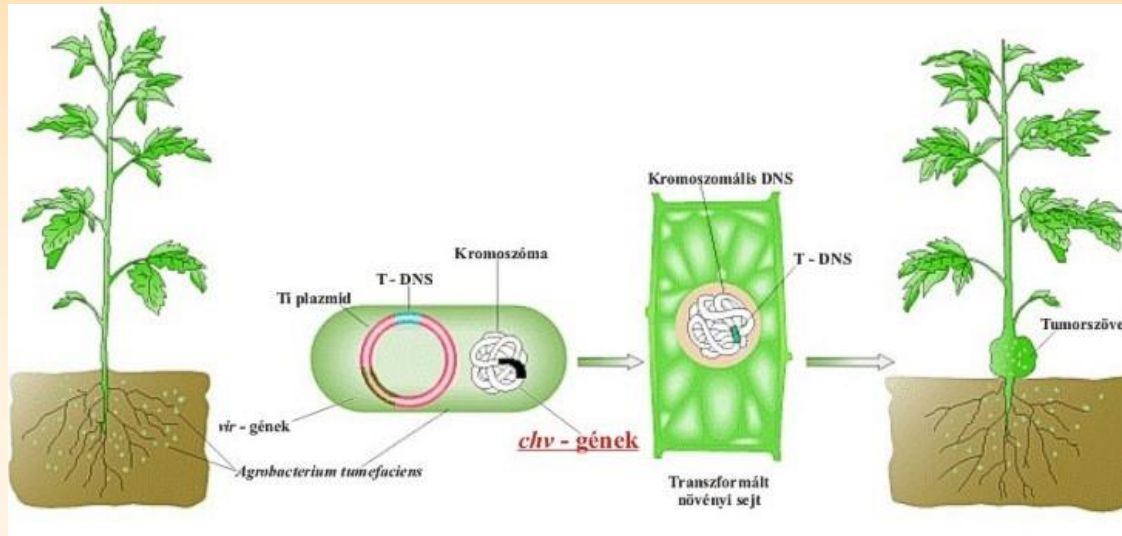
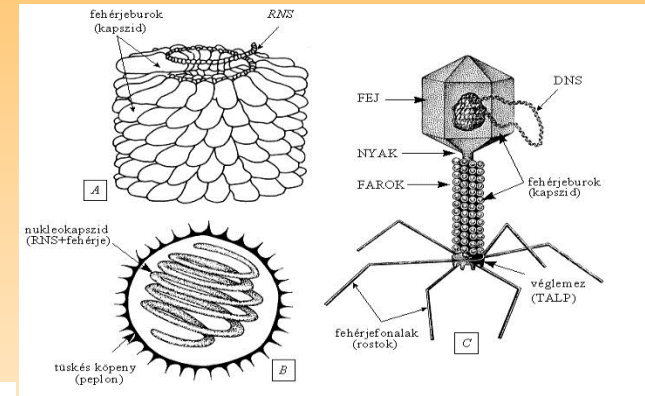
# *Biolisztikus transzformáció*



# 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)

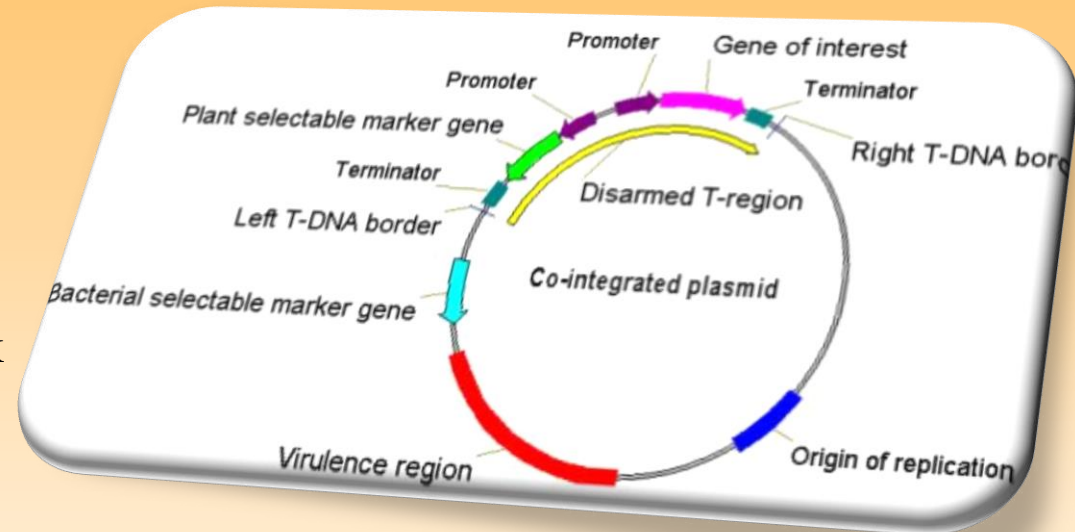
Gazdakörük rendkívül széles



- 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 tartalmazza,
- A T-DNS régiót T-DNS határszekvencia határolja,
- Növényi szelekciógént tartalmazza
- T-DNS-en belül endonukleáz felismerőhelyeket tartalmazza

Helper plazmid tartalmazza a *vir* géneket

# Vektorok

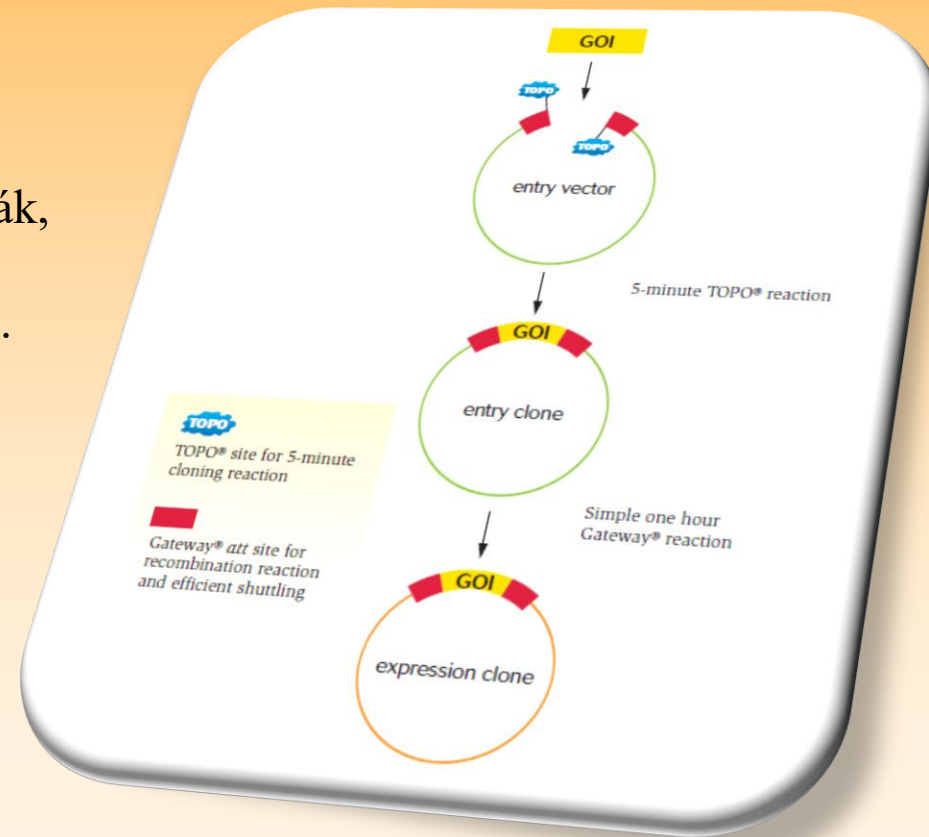
Definíció: Az a DNS szakasz vagy molekula, mely egy adott sejten belül képes replikálódni, pl.

- 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
- restriktációs enzim hasító hely idegen gén beépítésére alkalmas
- antibiotikum-rezisztencia marker
- riporter gén,
- promóter

## Gateway technology



# Génkonstrukciók

A funkcionális *génkonstrukciónak* két alkotóelemmel kell rendelkeznie.

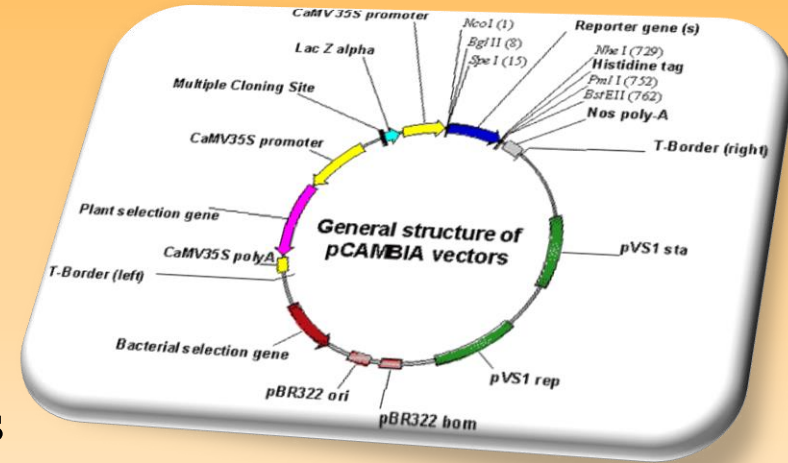
➤ DNS-szakasz a **kódozó régió**, mely egy információközvetítő molekula, az RNS átmásolásához (transzkripció) és adott esetben a fehérjék szintéziséhez (transzláció) szükséges információt tárolja.

➤ 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:<br>β-estradiol   | lúdfű      | Hajtás,<br>kallusz,<br>csíráztatott<br>mag | 15-60%      | Zuo et al. 2001                     |
| Hősokk                   | lúdfű      | csíranövény                                |             | Hoff et al. 2001                    |
|                          | dohány     | mag, levél                                 | 40-100%     | Liu et al. 2005<br>Wang et al. 2005 |
|                          | paradicsom | Hajtás<br>internódium                      | 5-14%       | Cuellar et al. 2006                 |
|                          | kukorica   | Kallusz,<br>éretlen embrió                 | 100%        | Zhang et al. 2003                   |
| Embrió<br>specifikus     | szója      | Szomatikus<br>embriógenézis                | 5-60%       | Li et al. 2007                      |
| Microspora<br>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.

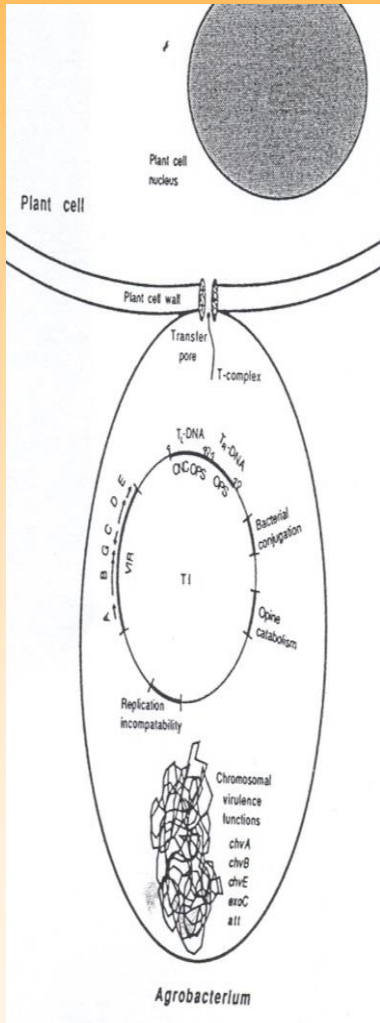
A sejtosztódás és a sejtfalat alkotó poliszacharidok és a lignin szintézise közben jellegzetes vegyületek szabadulnak fel (fenolos komponensek, cukor és származékai), melyek az Agrobaktérium számára jelek (SIGNAL).

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  $\beta$ -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

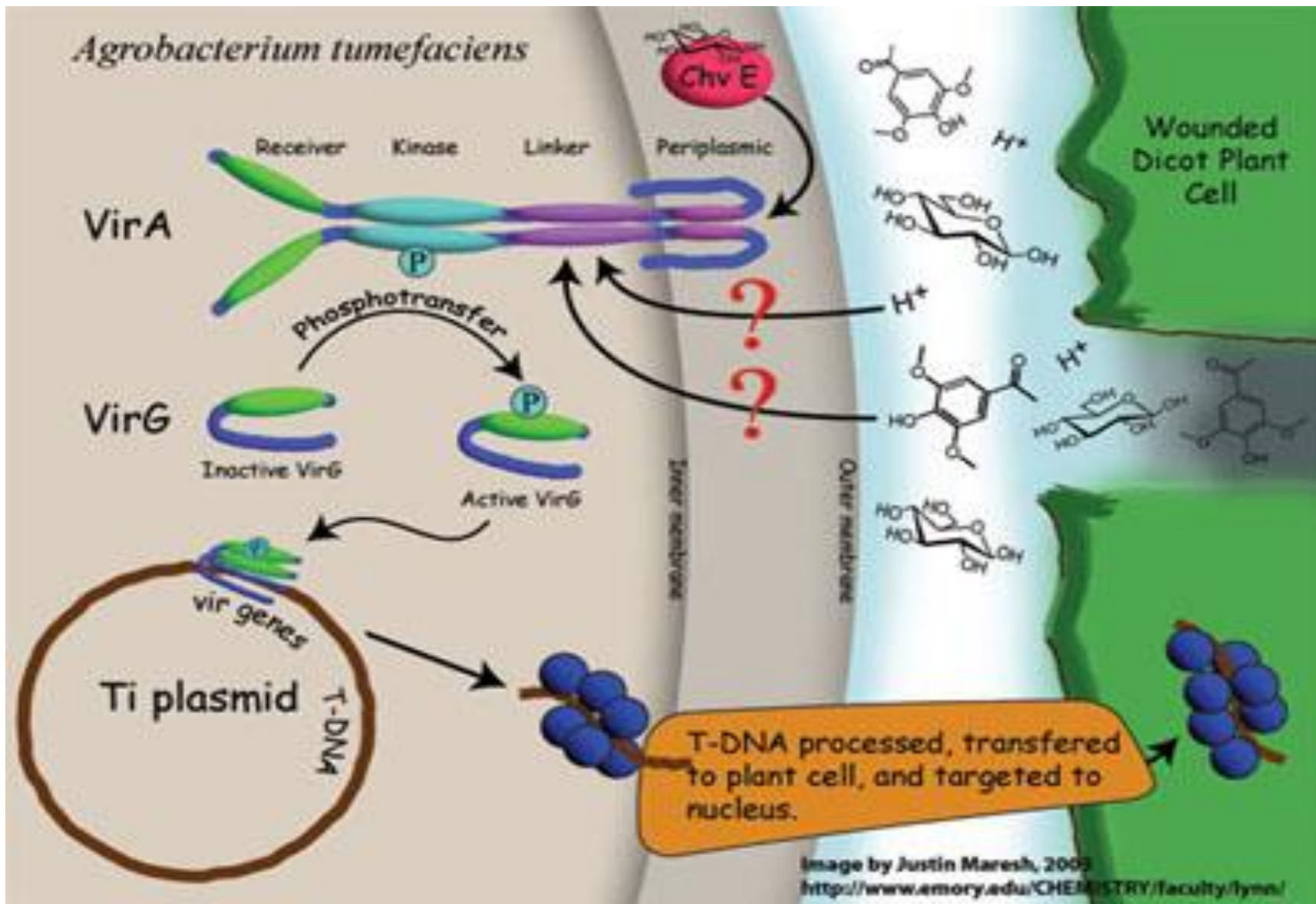
Ez a folyamat szabályozott és függ attól, hogy a baktérium milyen érzékenyen reagál a növény sebzésre adott válaszára (fenolok, cukrok)

*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





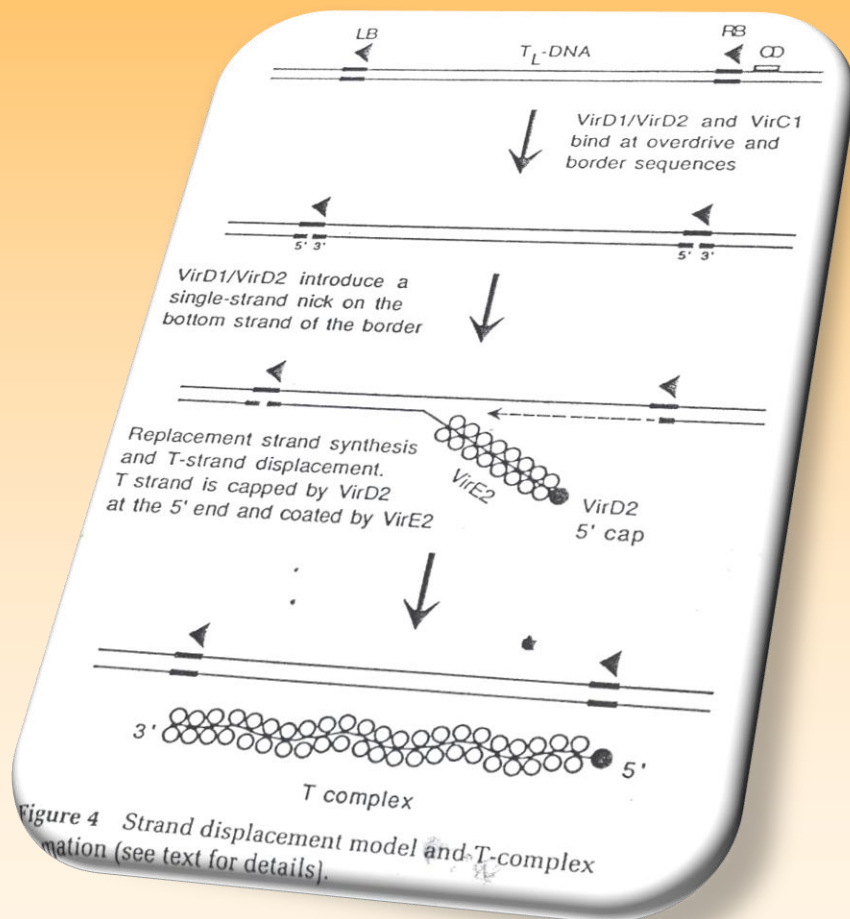
# A T-DNS szállítás folyamata

## 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

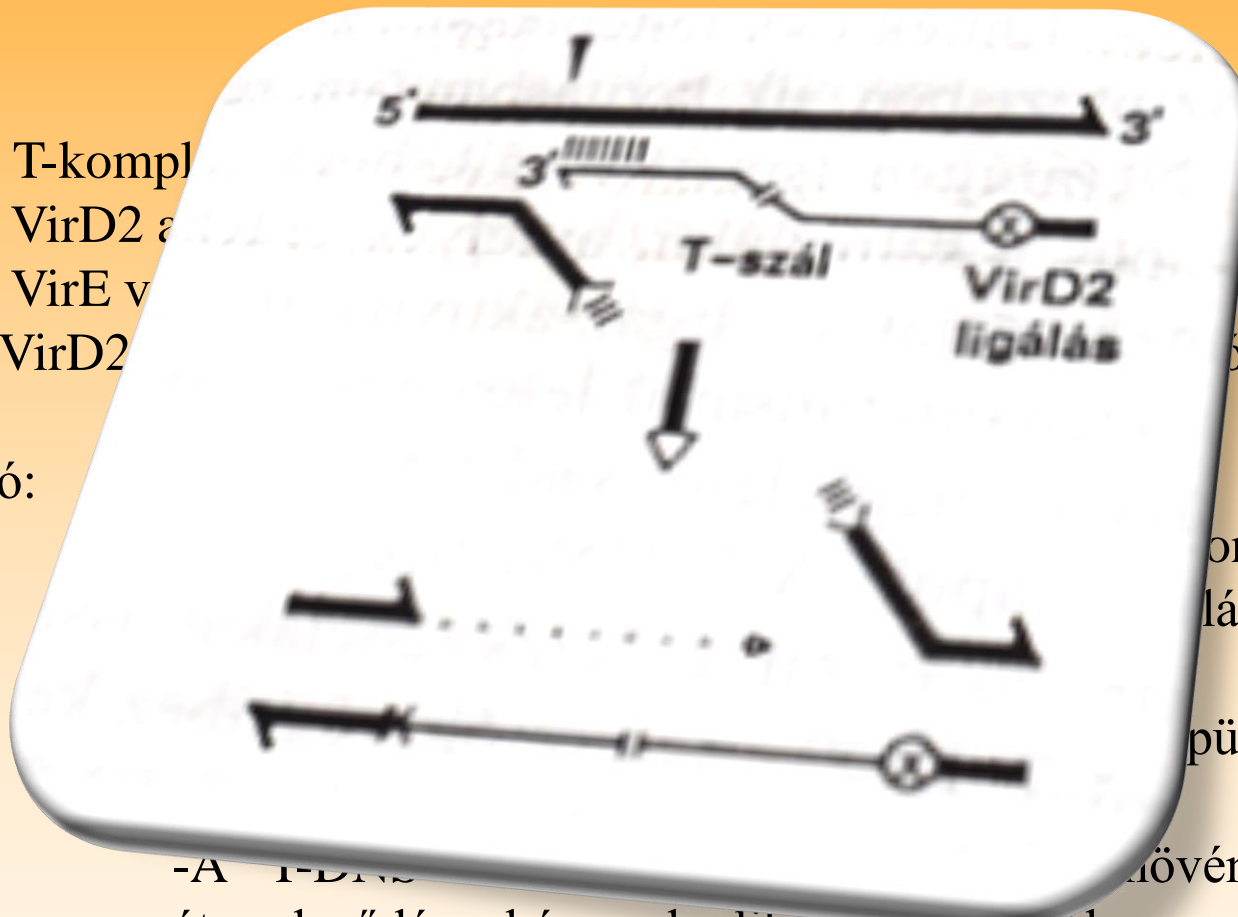
-Szállítás: T-kompl

- VirD2 a

- VirE v

-VirD2

-Integráció:



-A T-DNS

átrendeződésre képes, duplikációk, deleciók

sejtmagba

oldást

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

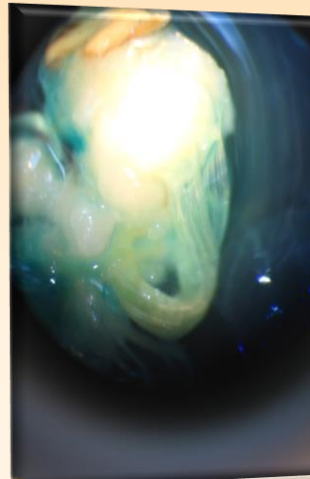
Transzformálás  
transzgenikus növény regenerálása

# *Növény regeneráció*

Genetikai módosítás

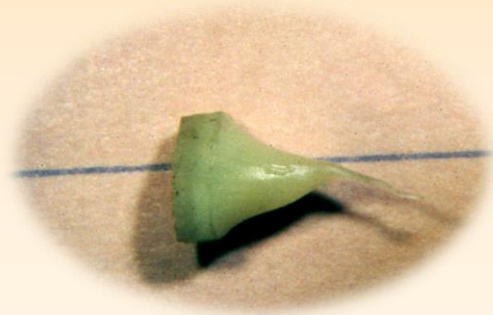


- Növény → Sejt → Növény
- Determinált sejt → Dedifferenciáció → Redifferenciáció



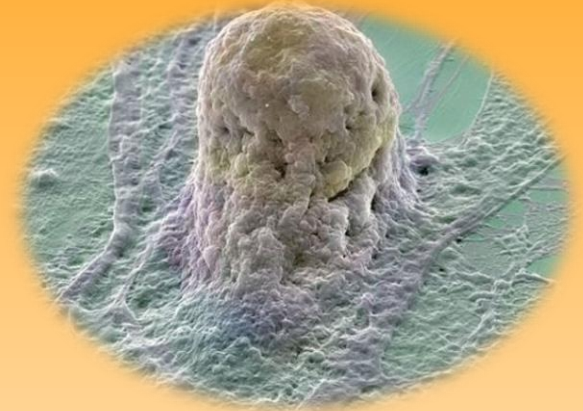
# Növényi sejt és szövettenyésztési technikák

- 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)

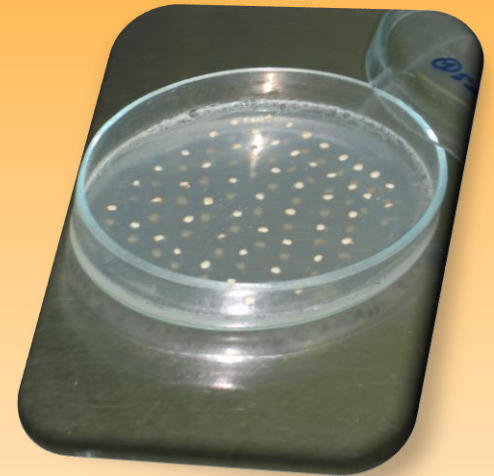
Éretlen virágzat

Embrió-éretlen, érett

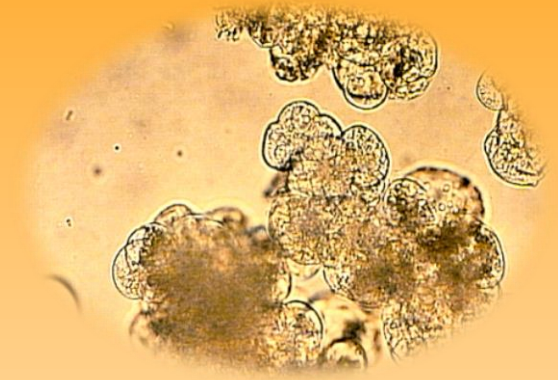
**Generatív sejtek:**

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*



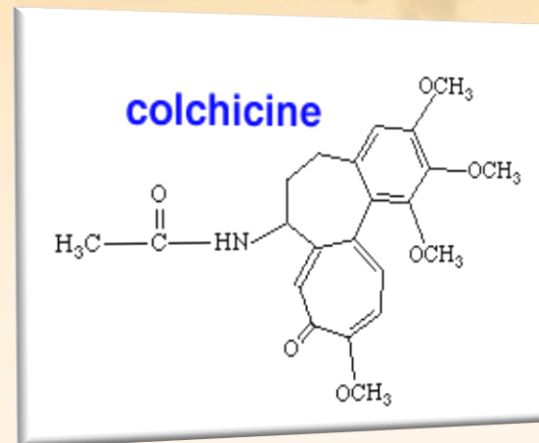
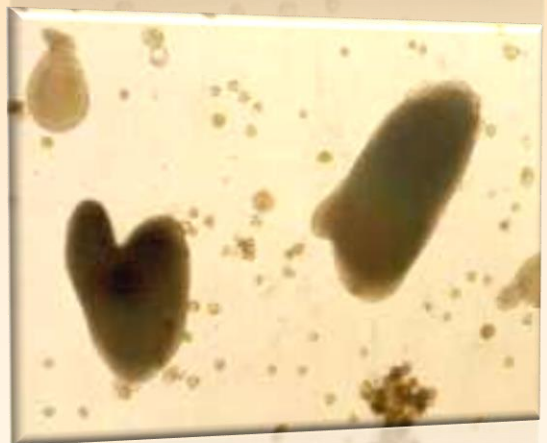
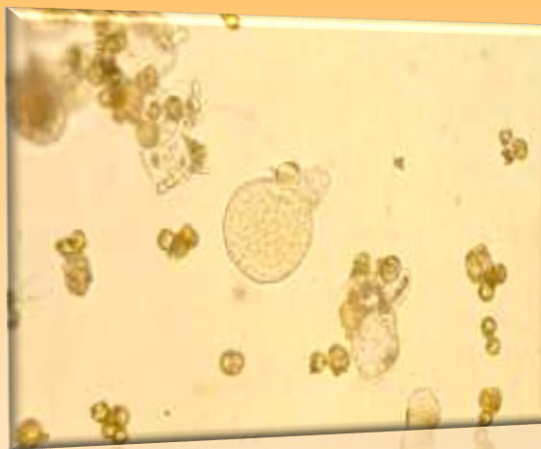
- A protoplaszt olyan sejtmembránnal határolt növényi sejt, melyek sejtfalát eltávolítottuk
- Sejtszuszpenzióból vagy mesophylumból hozható létre
- Növények esetében az egyetlen regenerációs rendszer, mely egy sejtől indul ki
- Transzgénikus növény előállítás, tranziens génextpressziós vizsgálatok

# *Haploid szövettenyésztési technikák*

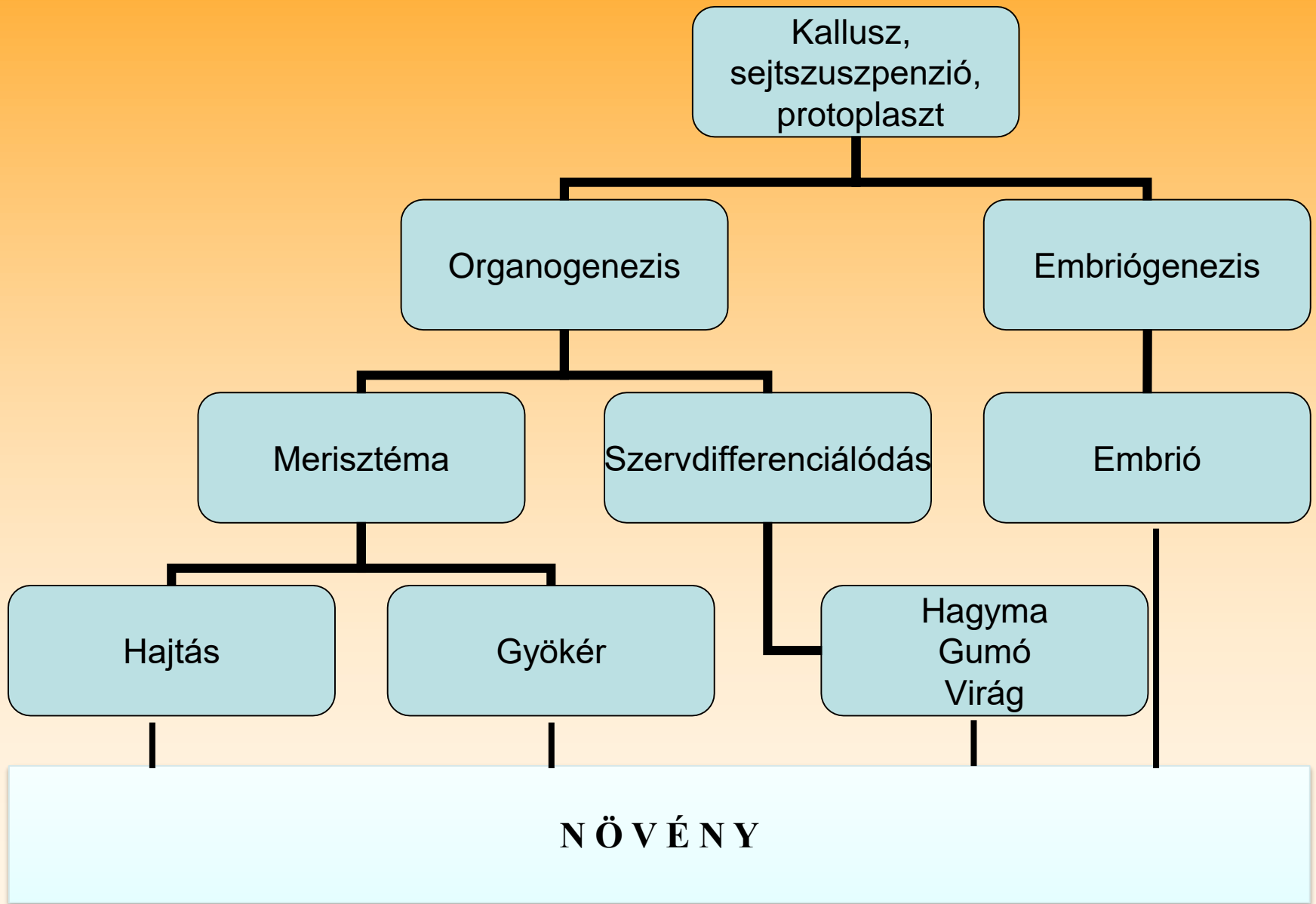


- A növényi gametophyton *In vitro* tenyésztése  
Mikrospora, petesejt, ...
- Rediploidizáció -> homozigóta növény
- A legelterjedtebb *in vitro* nemesítési technika
- Transzformációja egy lépésben  
homozigóta transzgénikus növényt eredményez

# Haploid szövettényészeti 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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1900 mg/l  $\text{KNO}_3$ ; 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .
- Mikroelemek: 6,2 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 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

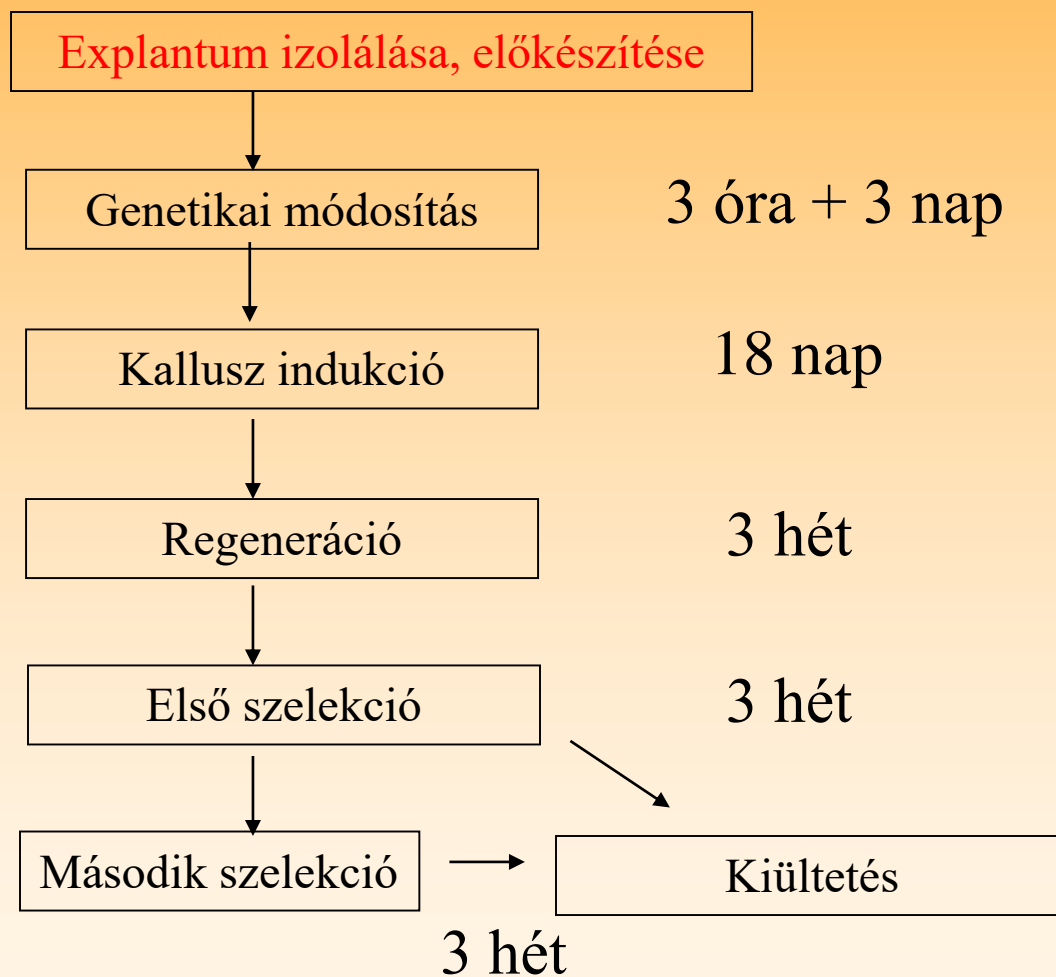


# Regeneráció



- 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

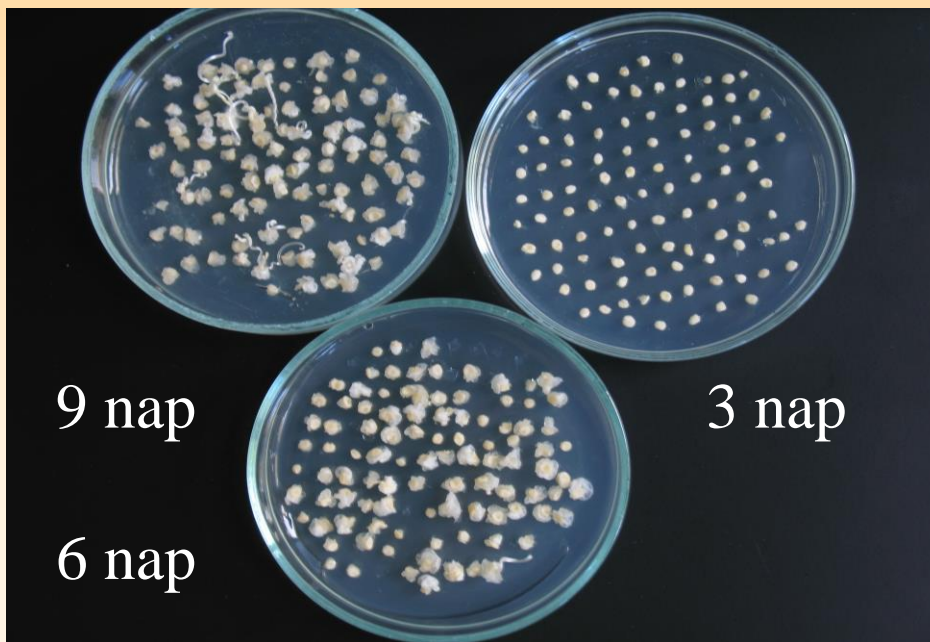
- Leggyakrabban használt explantumok:  
Éretlen embrió (kora)  
Érett embrió



izolálás



1-1,5 mm

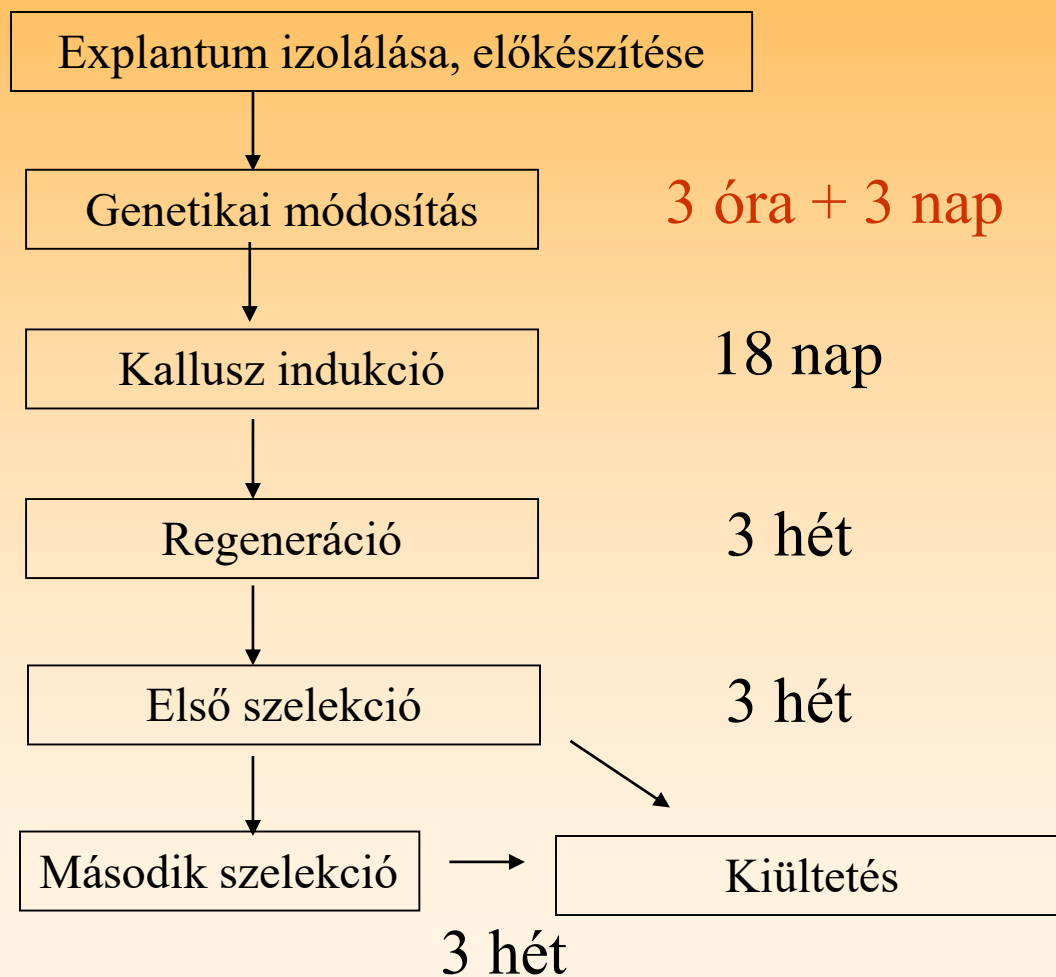


9 nap

6 nap

3 nap

# Növény transzformáció főbb lépései



# *Tranziens génexpresszió*

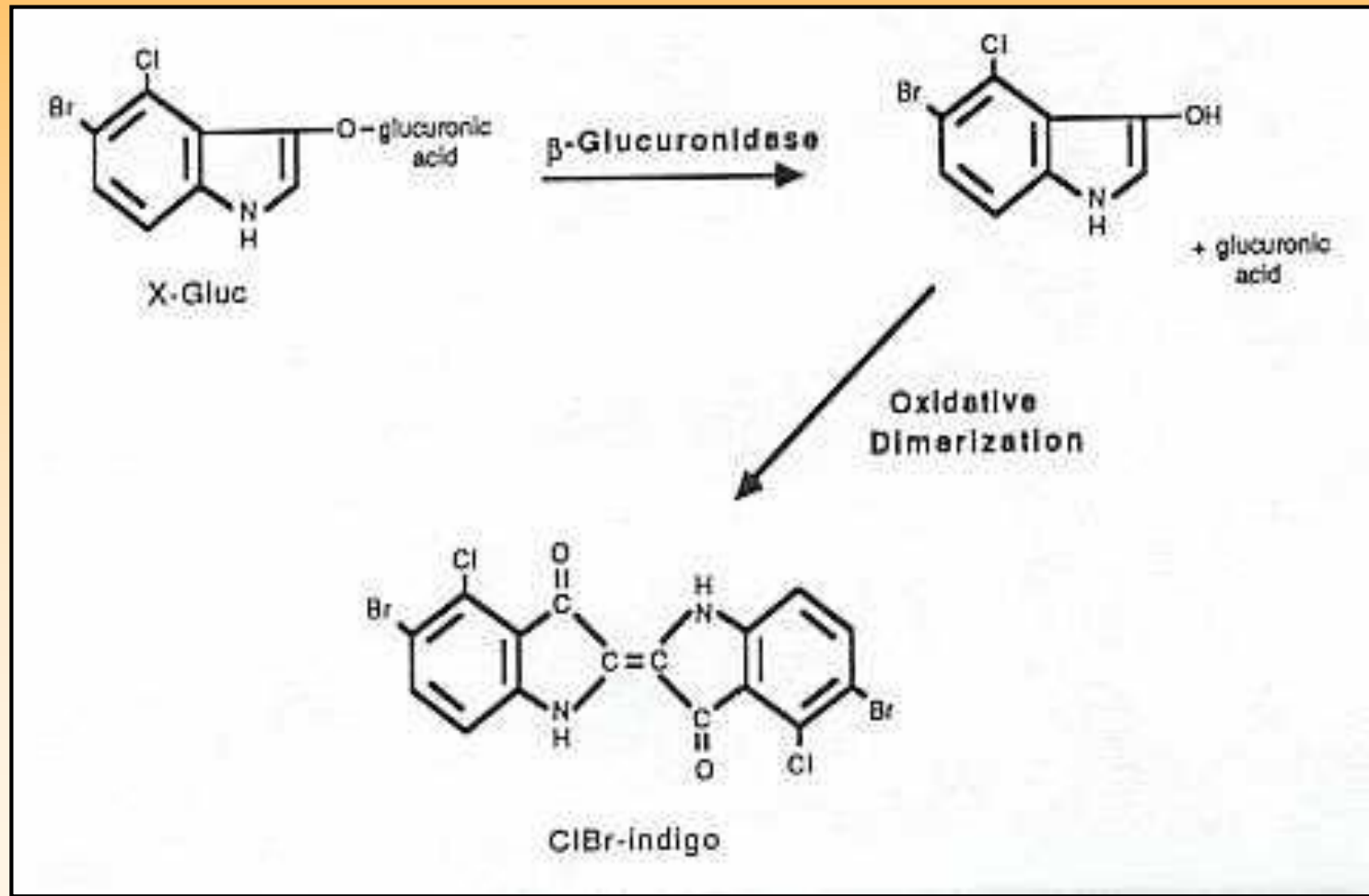
## *Riporter gén*

- Könnyen kimutatható érzékeny módszer
- Kvantifikálható
- Nem letális

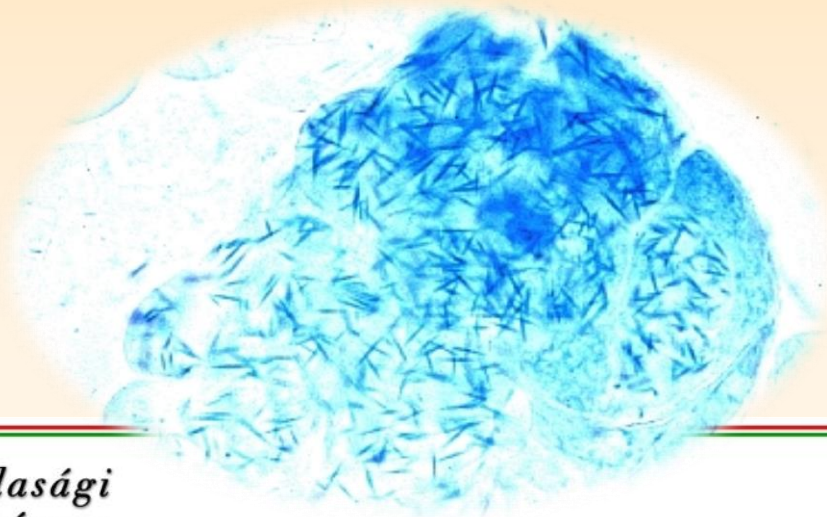
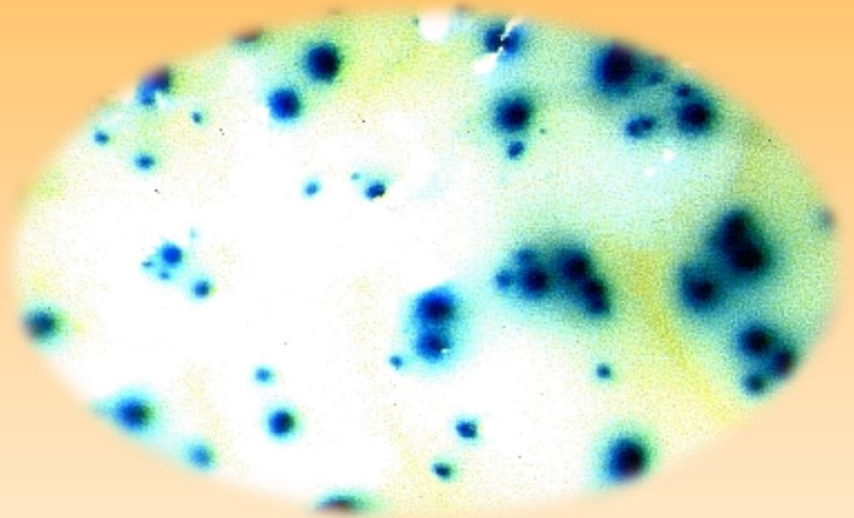
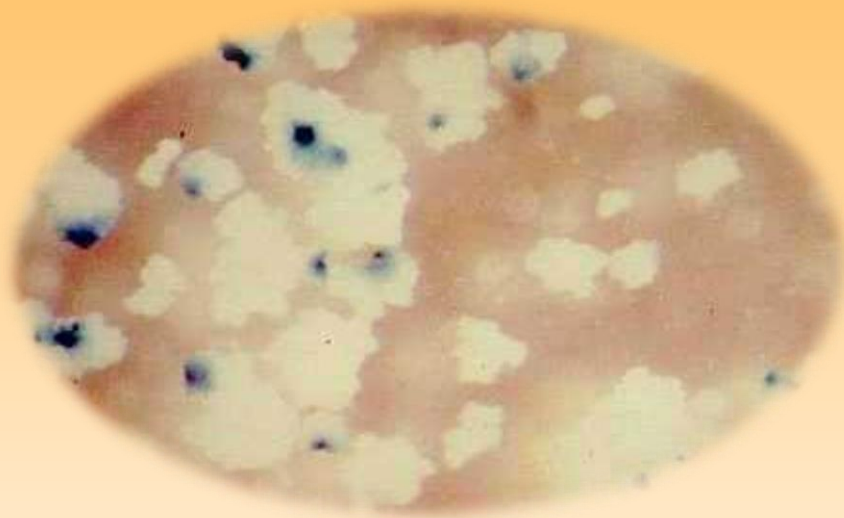
# *Leggyakrabban alkalmazott riporter gének*

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

# Riporter gének *gusA*



# Riporter gének *gusA*



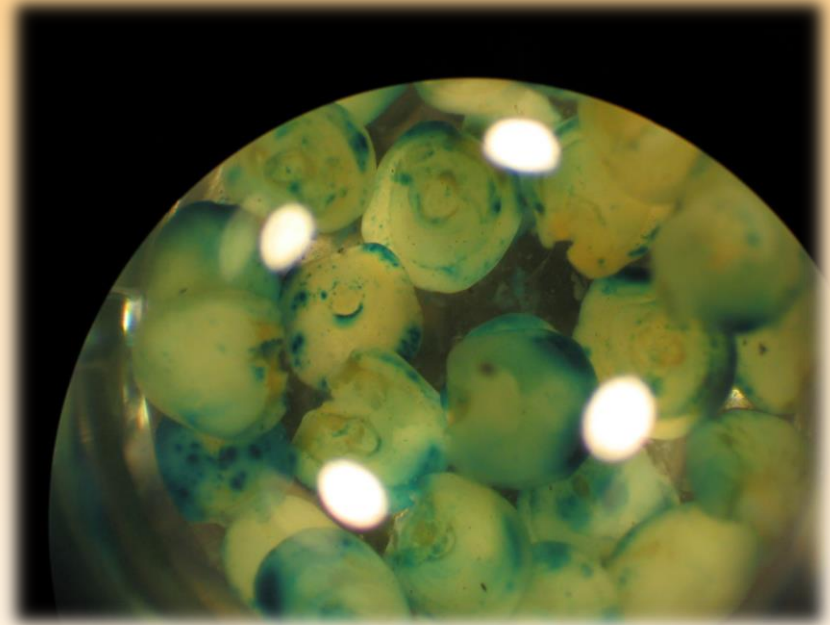


# *GUS festés*

Kontroll



Transzformált embriók

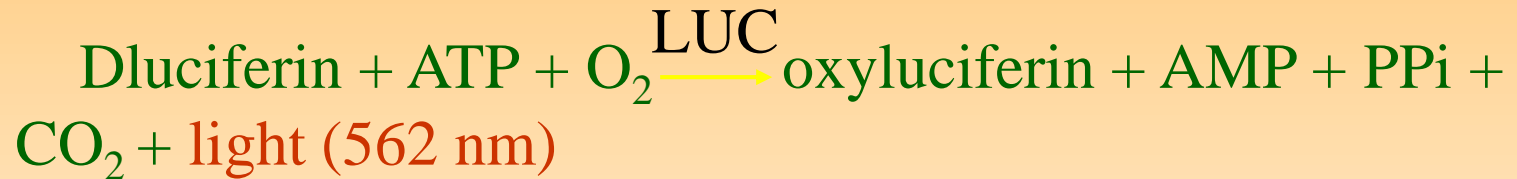




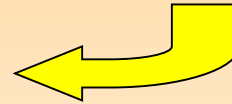
# Riporter gének

Luciferáz

*Photinus pyralis*



ultrasensitive digital  
CCD camera system

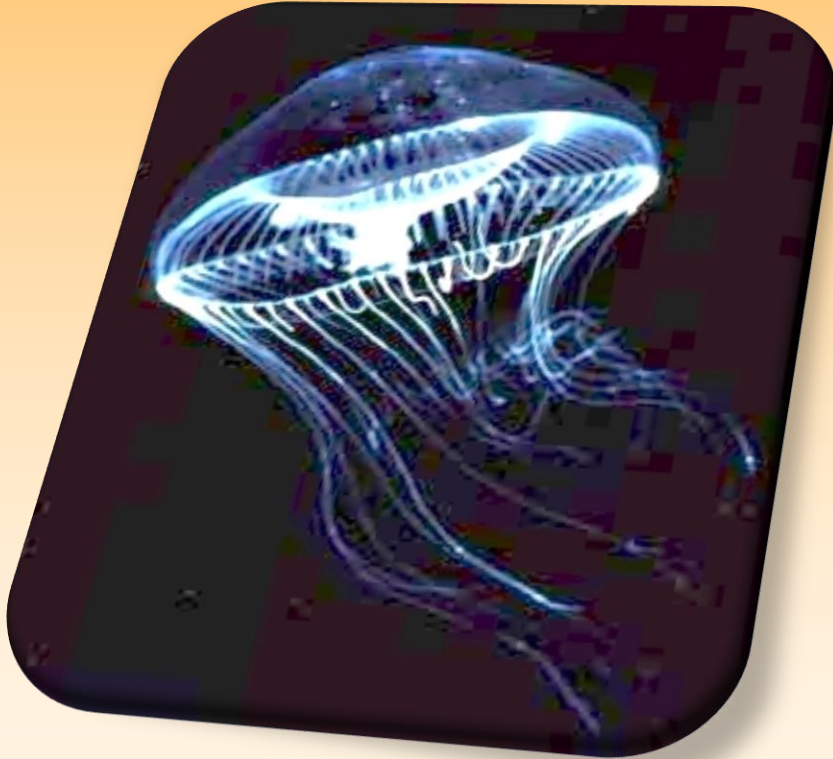


# *Riporter gének*

*luc*



# *Riporter gének* *gfp*



*Aequorea victoria*

# *Riporter gének*

## GFP

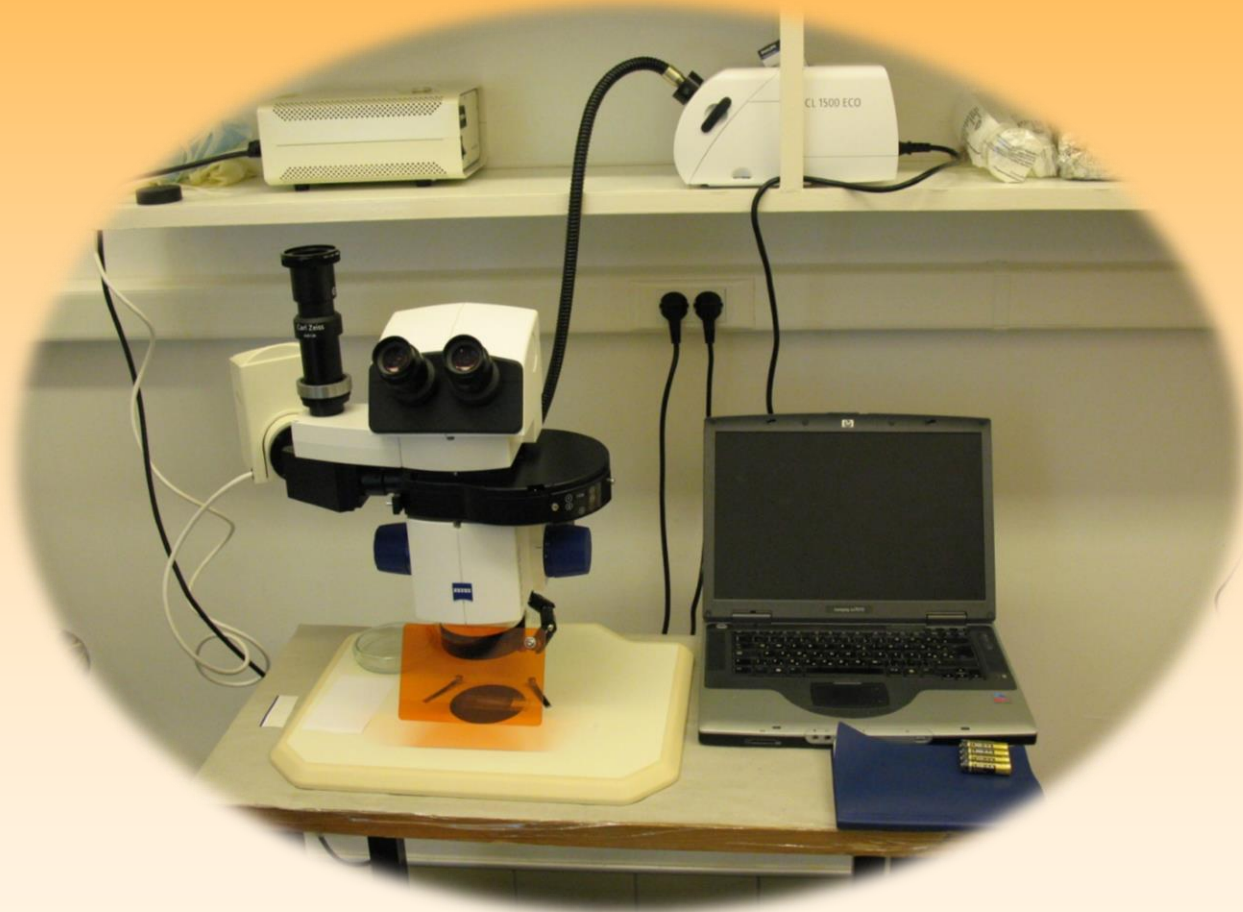


238 Apoaequorin - luciferin

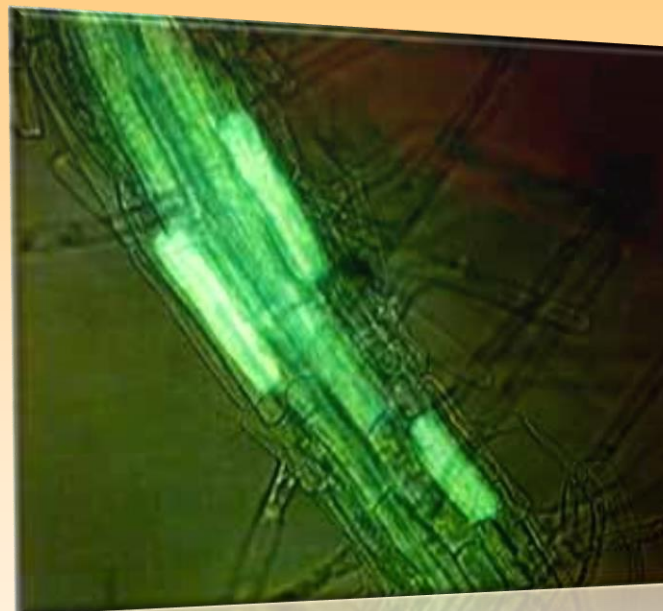
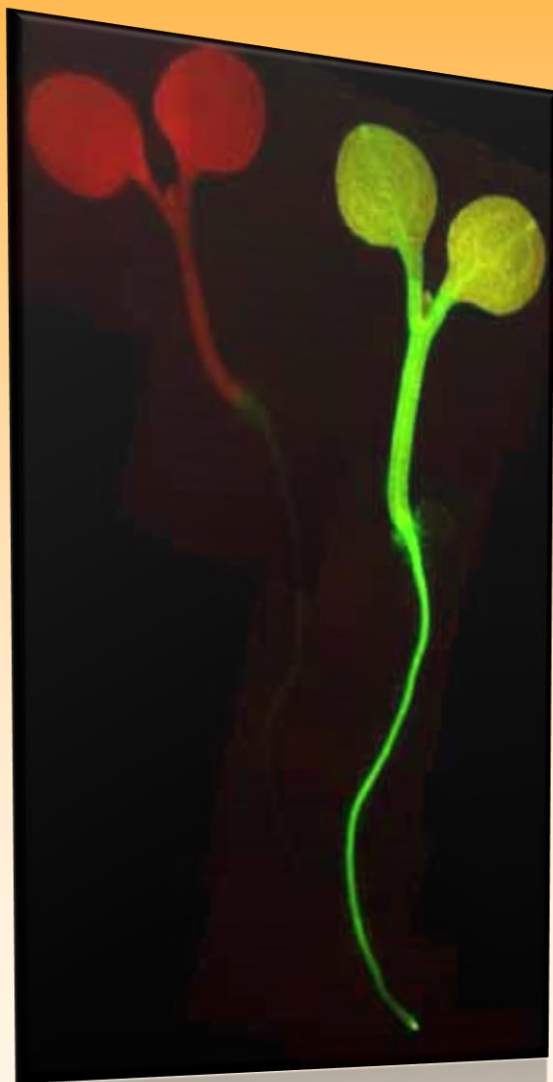
27 kDa monomer

pH 5.5 - 12.0

Temp. < 65 °C



# *Riporter gének* GFP

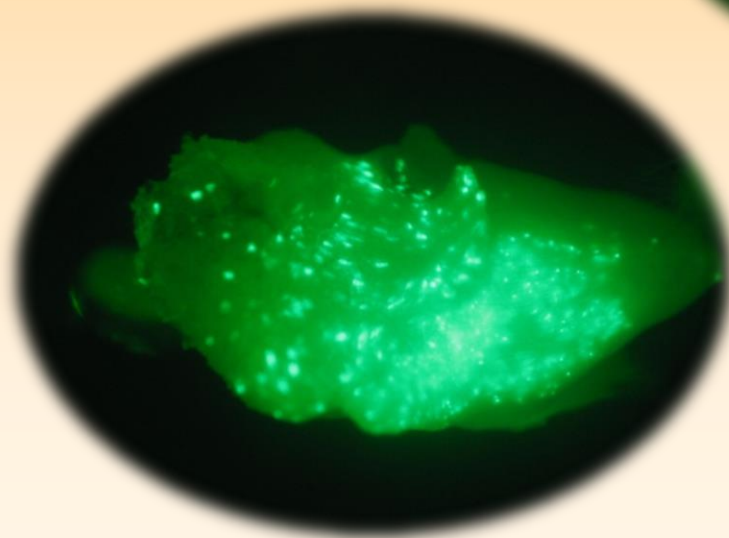
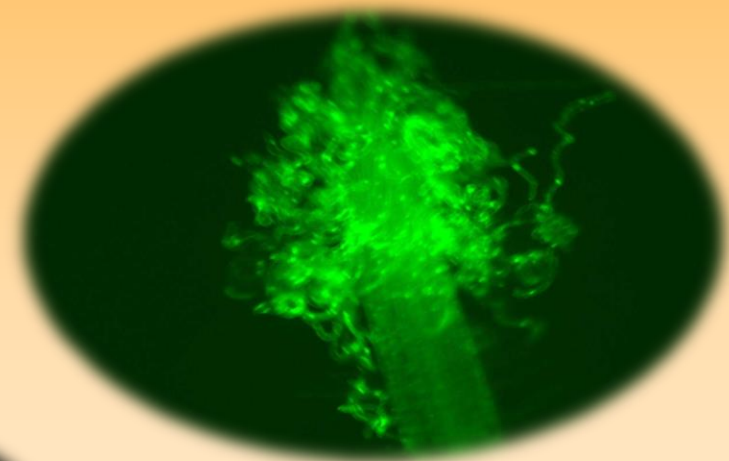


Arabidopsis

# *Riporter gének*



Control

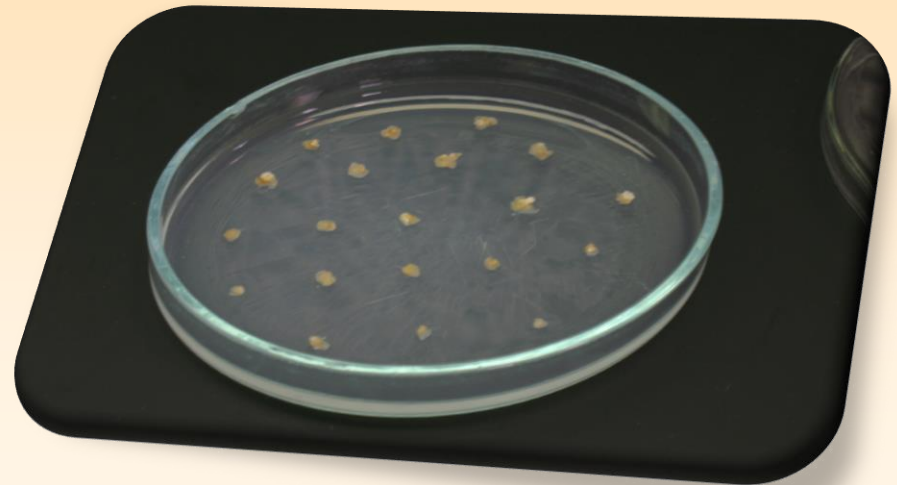


Transgenic



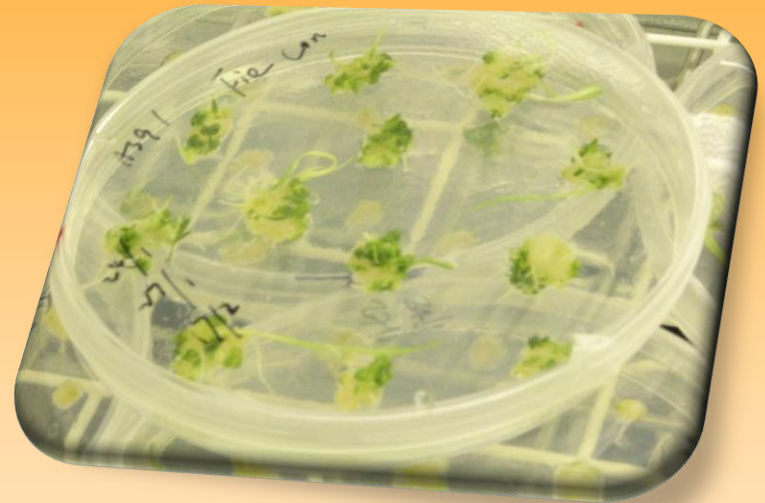
# *Kallusz indukció*

- 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 szelektációs ágensek

| Szelektív anyag                                     | Hatásmechanizmus   | Rezisztencia gén                          | Rezisztencia mechanizmus  |
|---|--|---|---|
| <b>I. Aminoglikozid típusú antibiotikumokkal</b>    |  |   |   |
| 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  |
| <b>II. Glufozinát-ammónium típusú herbicidekkel</b> |  |   |   |
| foszfinotricin/PPT/bialaphos                        | Gátolja a glutamin szintézist, ammónia felhalmozódást okoz | <i>bar</i>                                | Acetolálással detoxikál   |
| <b>III. Glifozát típusú herbicidekkel</b>           |  |   |   |
| 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*

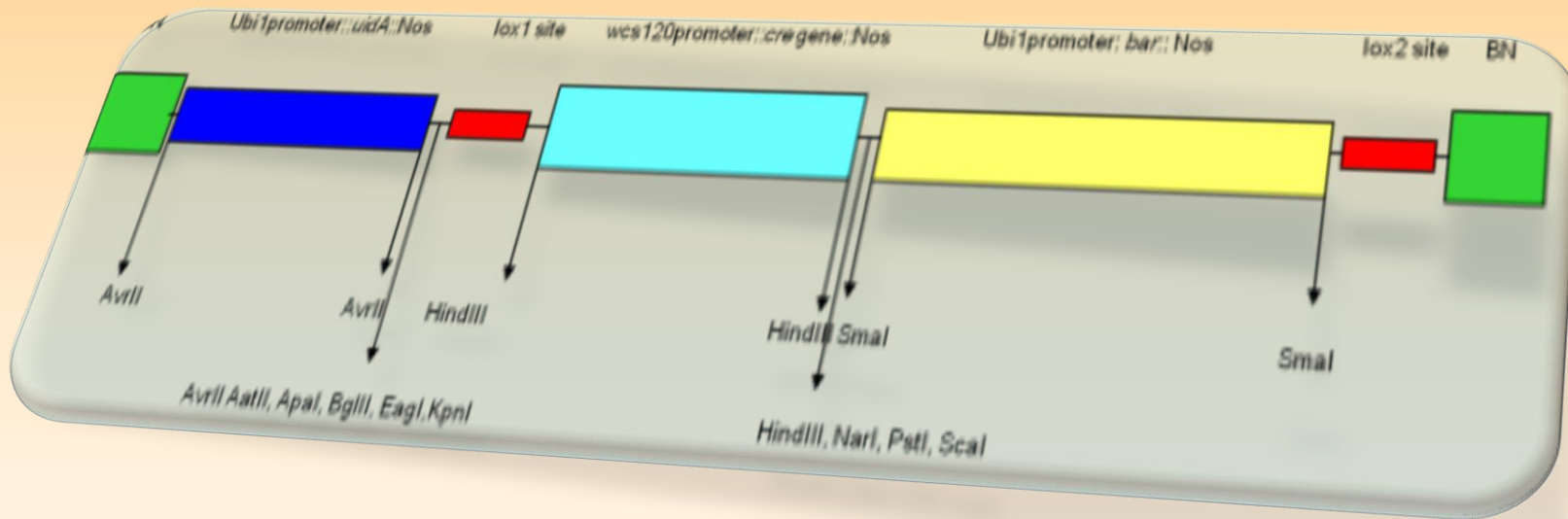
*Cre rekombinááz 38 kDa*

*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

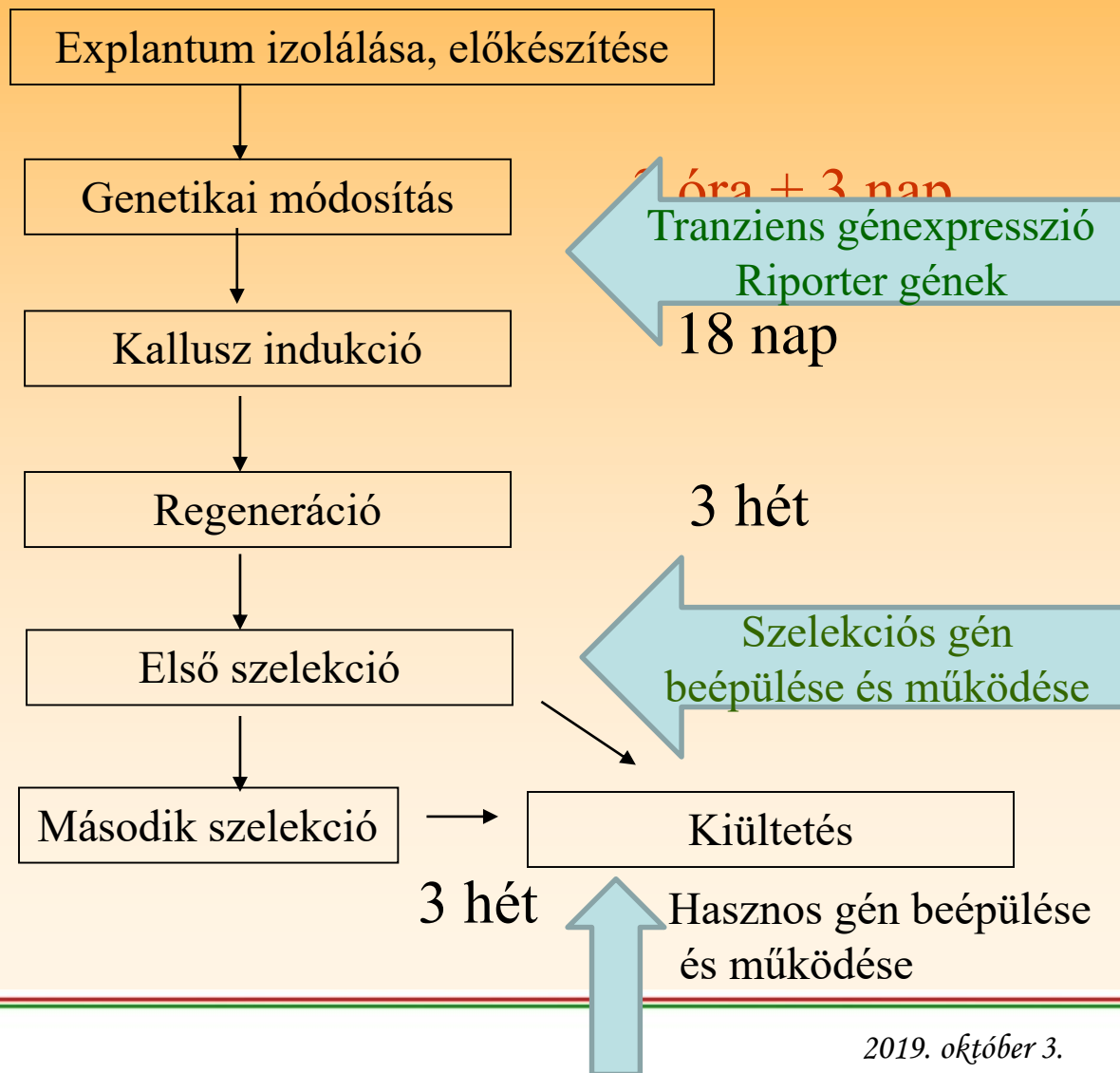
Transzformálható fajták:

Célpont: sejt, protoplaszt, szövet, növény

Hatékony *in vitro* regenerációs rendszer



# Növény transzformáció főbb lépései

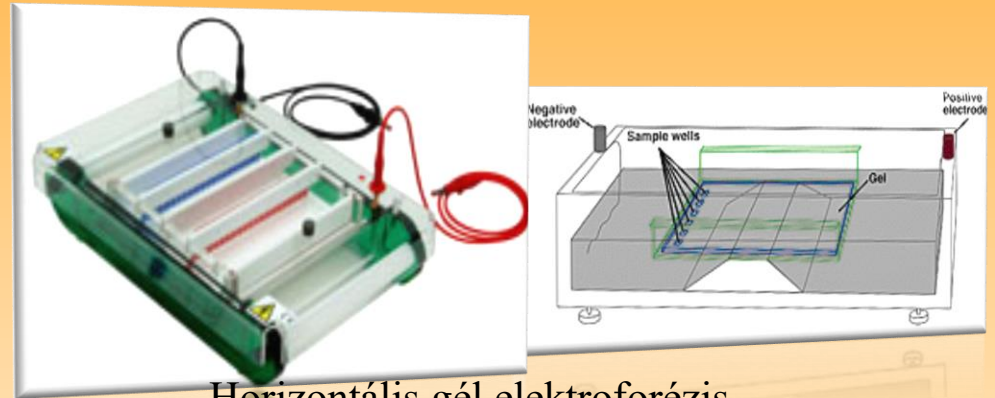


# *Transzgén kimutatása a transzformáció folyamatában*

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

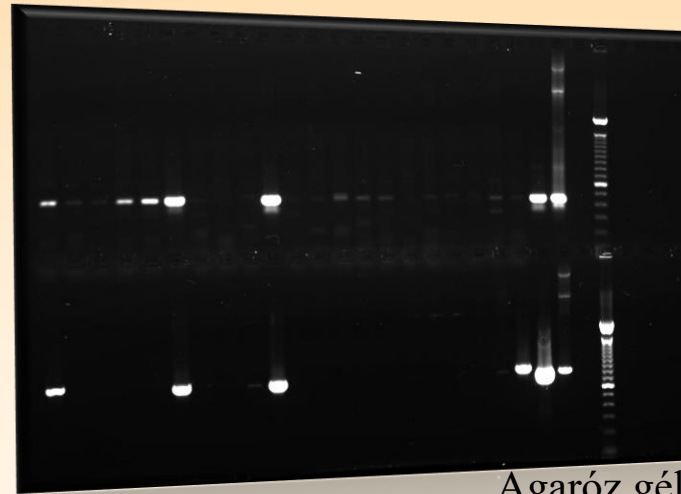
# PCR (polymerase chain reaction)

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

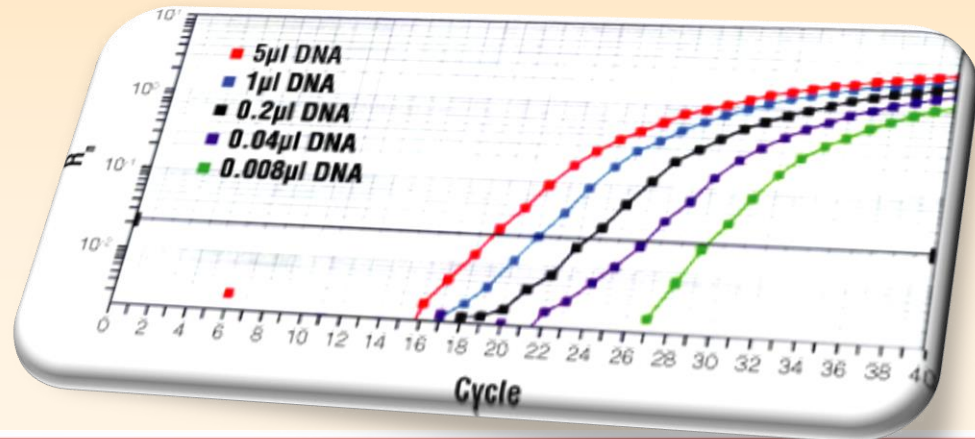
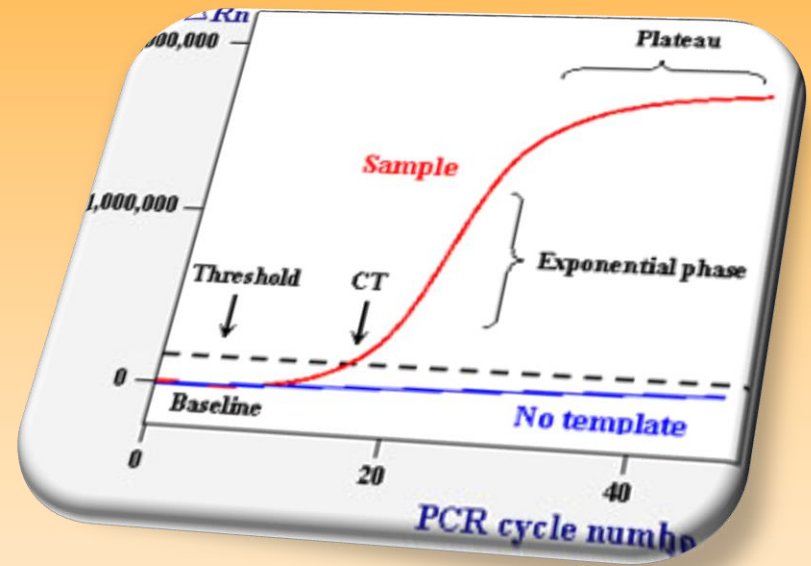
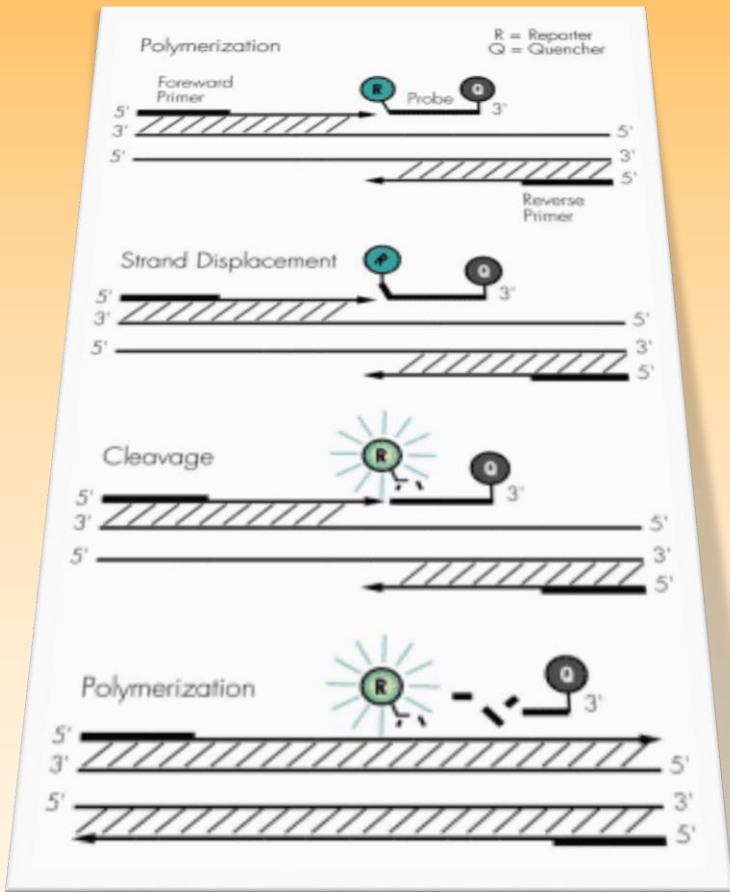
Sejtek, szövetek mRNS tartalmát is képes meghatározni reverz transzkriptáz enzim felhasználásával

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

## Fluoreszcenz riporter próba



# RT-PCR



T

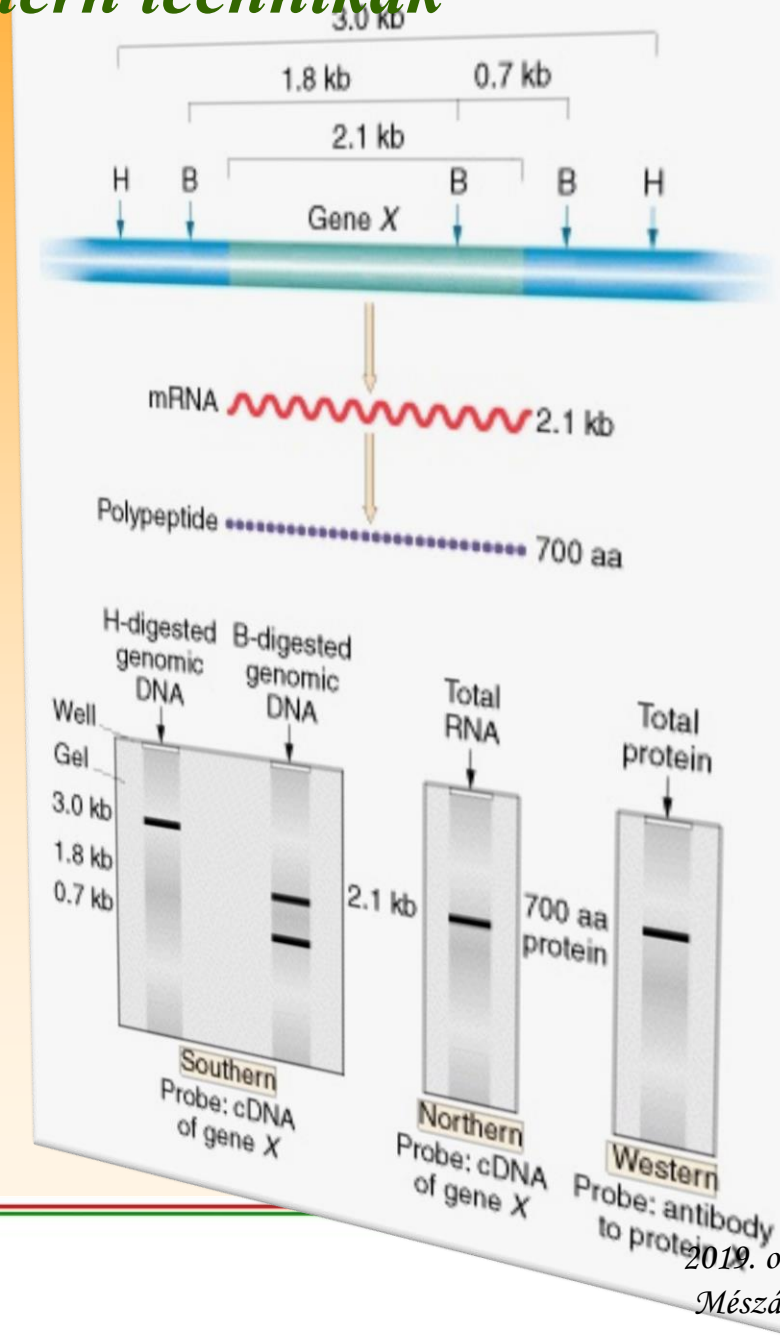
# A Southern, Northern és Western technikák

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.

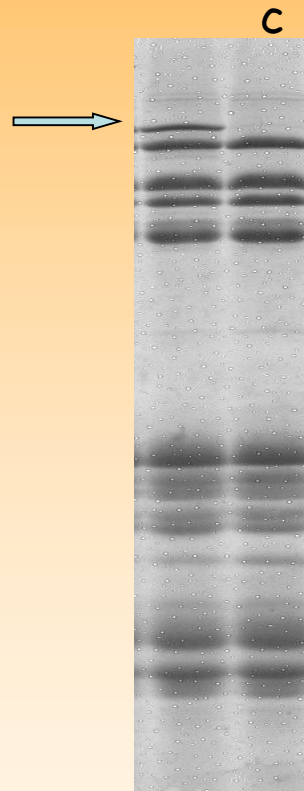
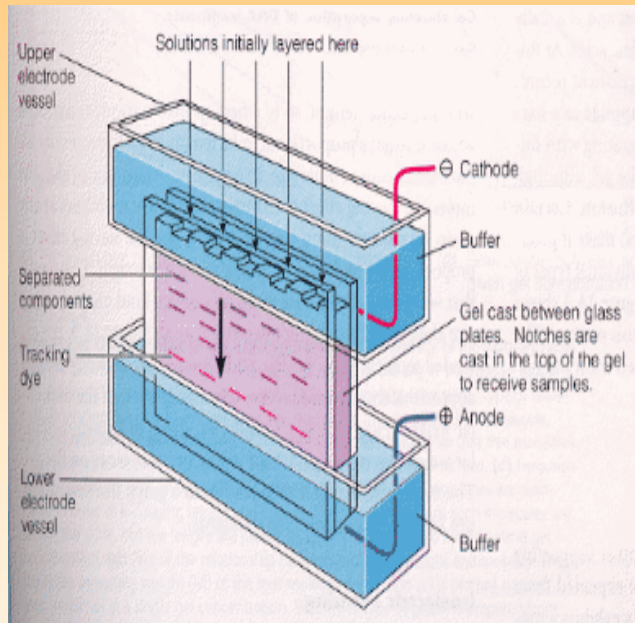
Southern-nel a gén DNS-e, Northern-nel a gén RNS-szinten történő kifejeződése, Western-nel a fehérje kifejeződése vizsgálható.



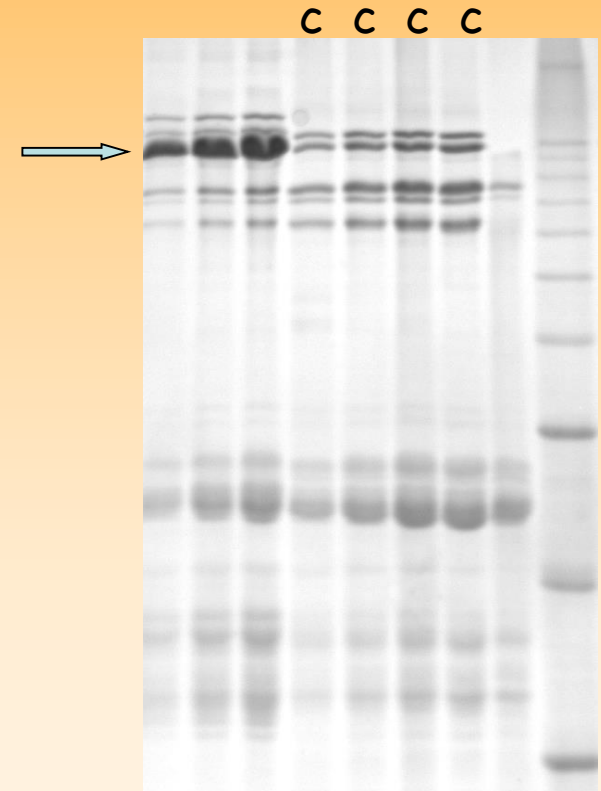
# A gén által expresszált termék kimutatása

## Fehérje kimutatás biokémiai markerekkel

### SDS-PAGE



HMW glutenin fehérje  
alegység expressziójának  
bizonyítása



HMW glutenin alegység  
magnövekedett  
mennyiségének kimutatása

T

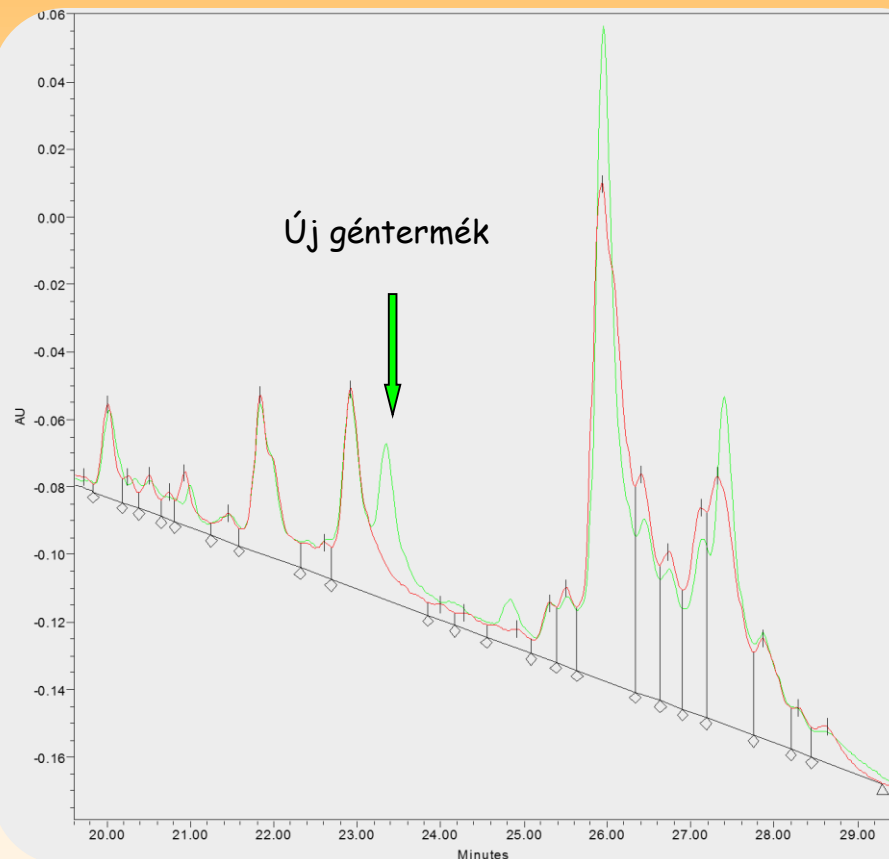
# Expresszált termék jelenlétének és/vagy megnövekedett mennyiségének kimutatása

Mennyiségi értékelést tesz lehetővé



HPLC - nagy hatékonyságú folyadék kromatográfia

Megnövekedett mennyiség

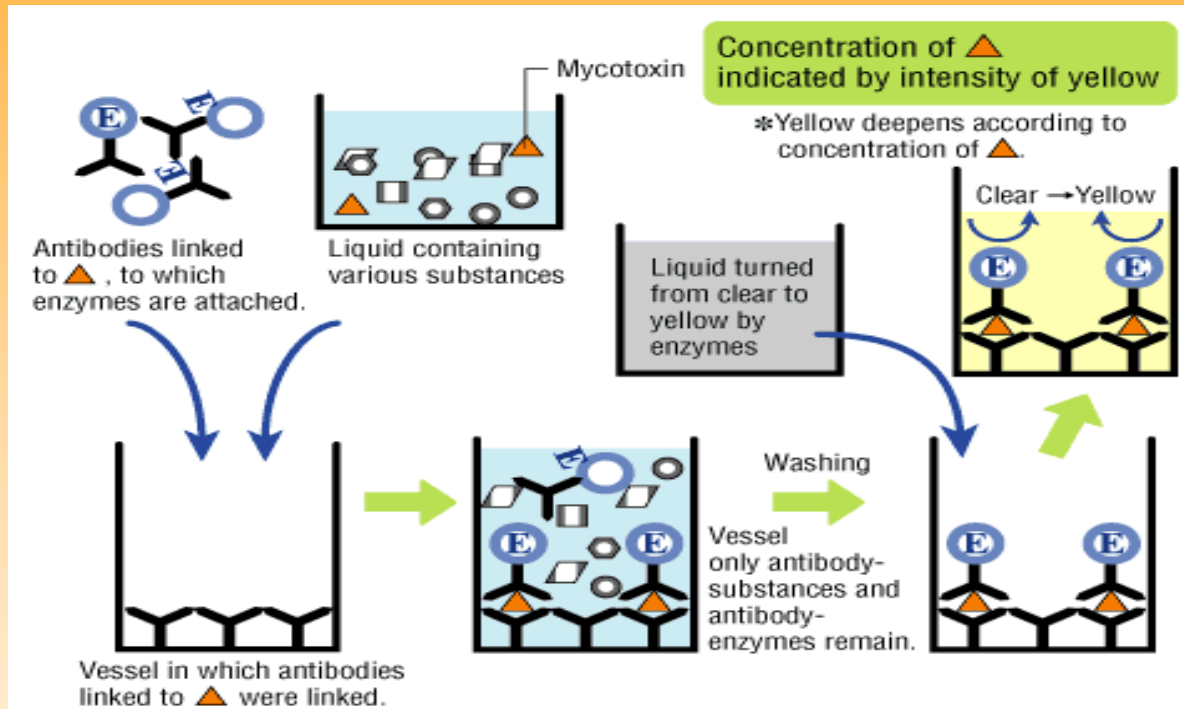


Búza tartalékfehérjék elválasztása RP-HPLC módszerrel

T



# ELISA (enzyme linked immunosolvent assay)



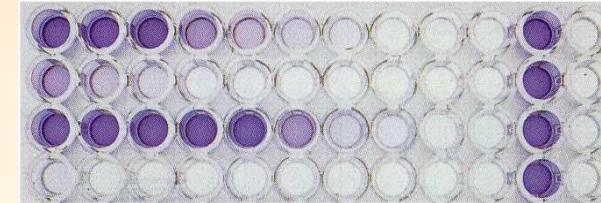
Antigén vagy antitest jelenlétének megállapítása +/-

Élelmiszer allergének kimutatása +/-

Drog jelenlétének azonosítása +/-

Mennyiségi értékelésismert koncentrációjú standard oldatokkal

Spektrofotometriás vagy fluoreszcenz detektálás



# A génbeépülés helyének meghatározása

## Térképező populáció előállítása

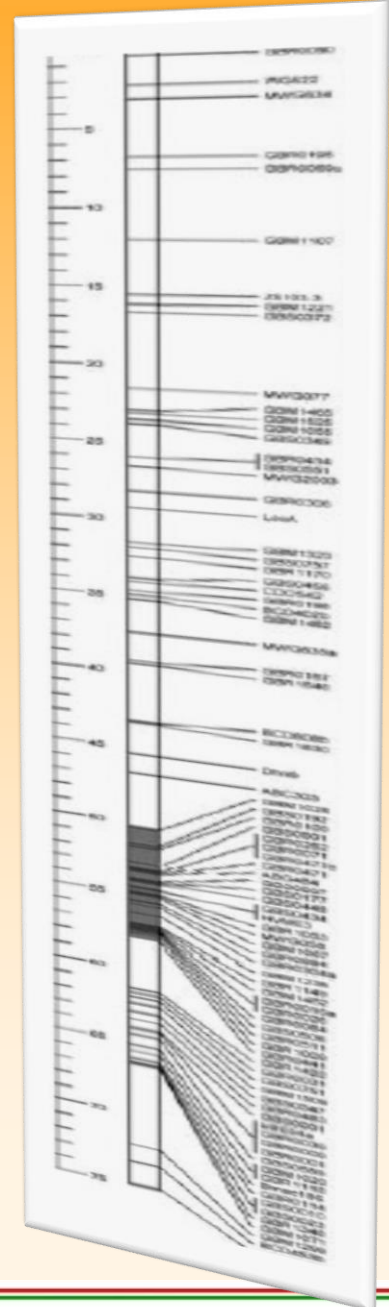
Transzformált növény x nem transzformált konroll növény

Mikroszatellit és EST primerek alkalmazásával

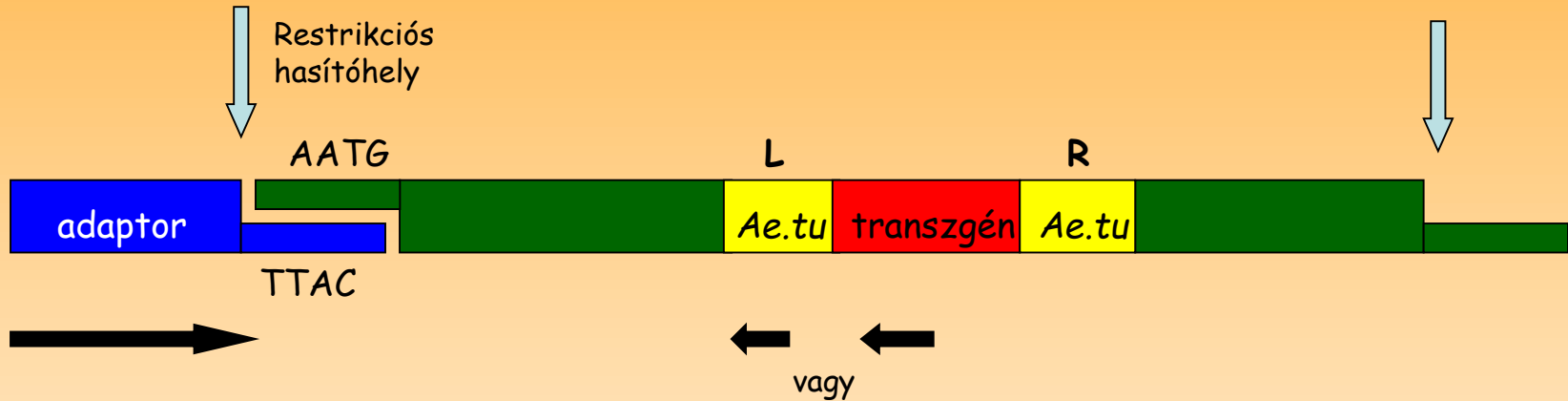
**Genome walking**

**Rolling cycle**

**FiberFISH**

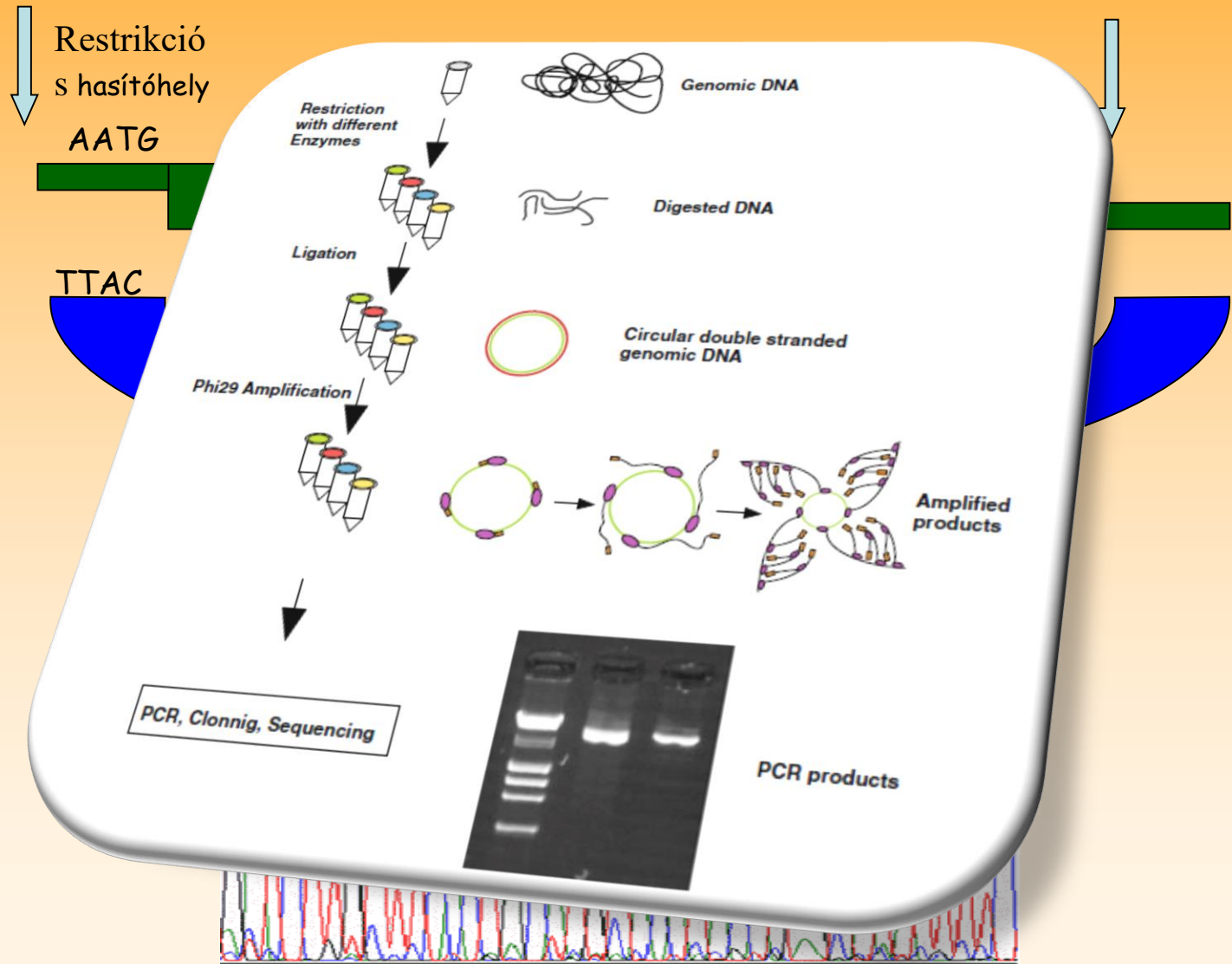


# Genome walking



- 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



# 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

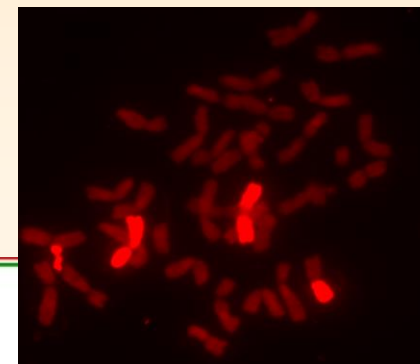
Jelölés (direkt, indirekt)

A kromoszóma és a próba DNS denaturálása

Hibridizálás

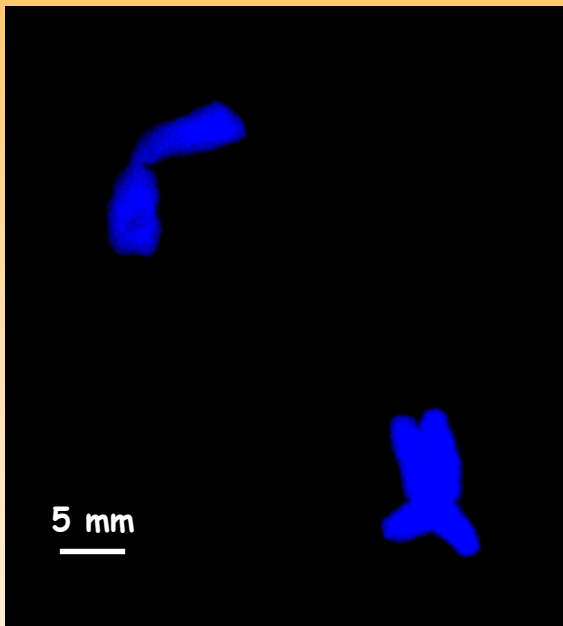
A nem homológ DNS szekvenciák lemosása

Detektálás, kontrasztfestés

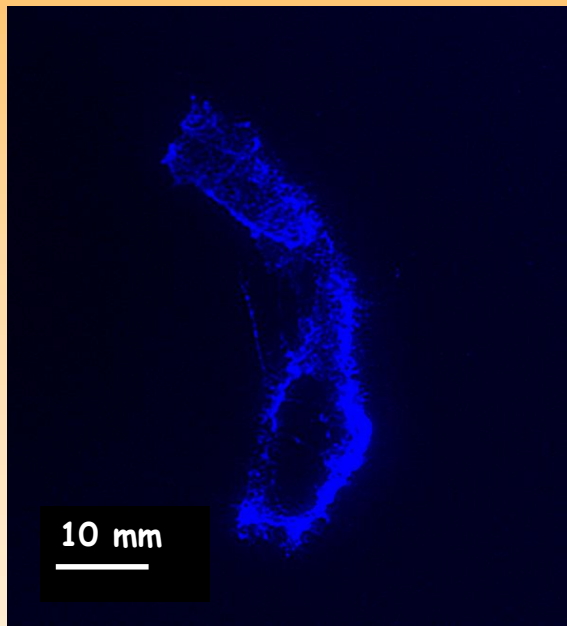


# *DNS szál preparálása kromoszómból*

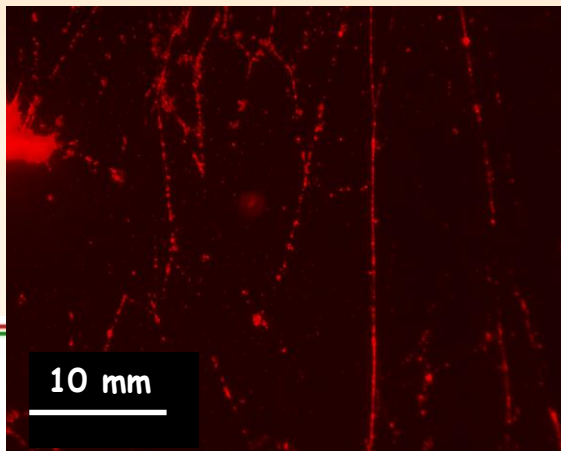
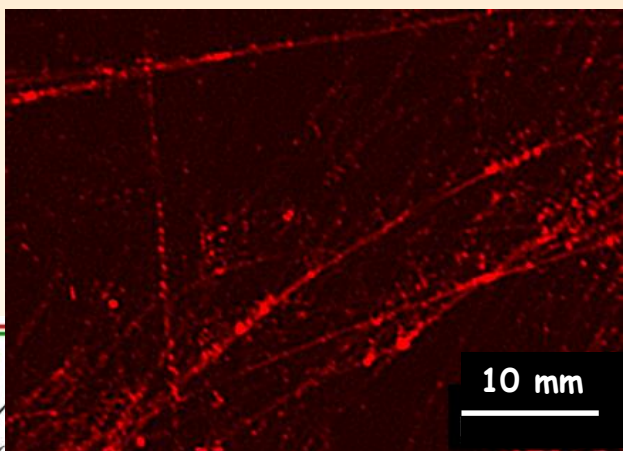
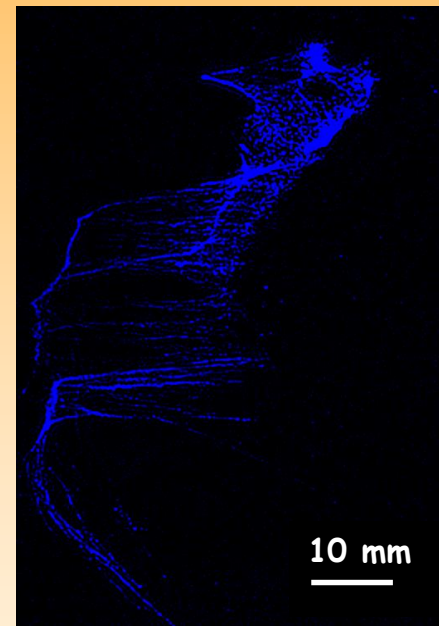
Emésztetlen kromoszómák



Emésztett kromoszóma  
(8 min, 65 °C, 180 mg mL<sup>-1</sup> Proteinase-K)



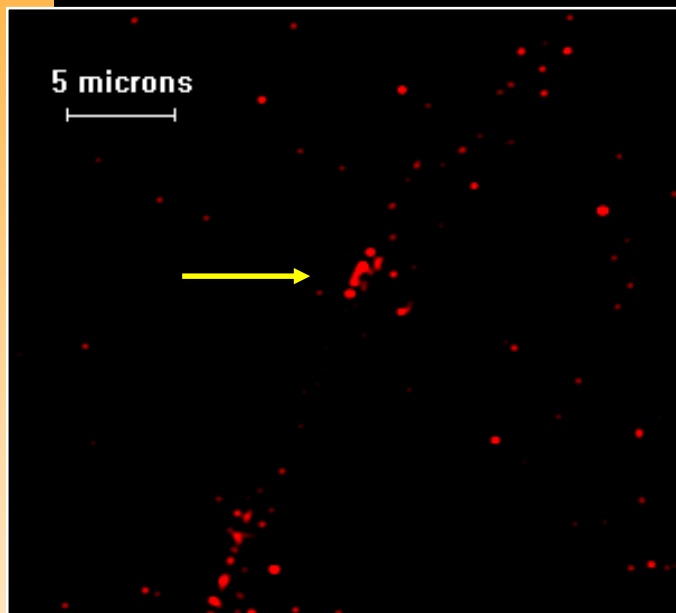
Emésztett kromoszóma  
mechanikai nyújtás után



← Fixált DNS preparátum

2019. október 3.  
Mészáros Ksára

# Alacsony kópiaszámú szekvenciák kimutatása DNS szálakon



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

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

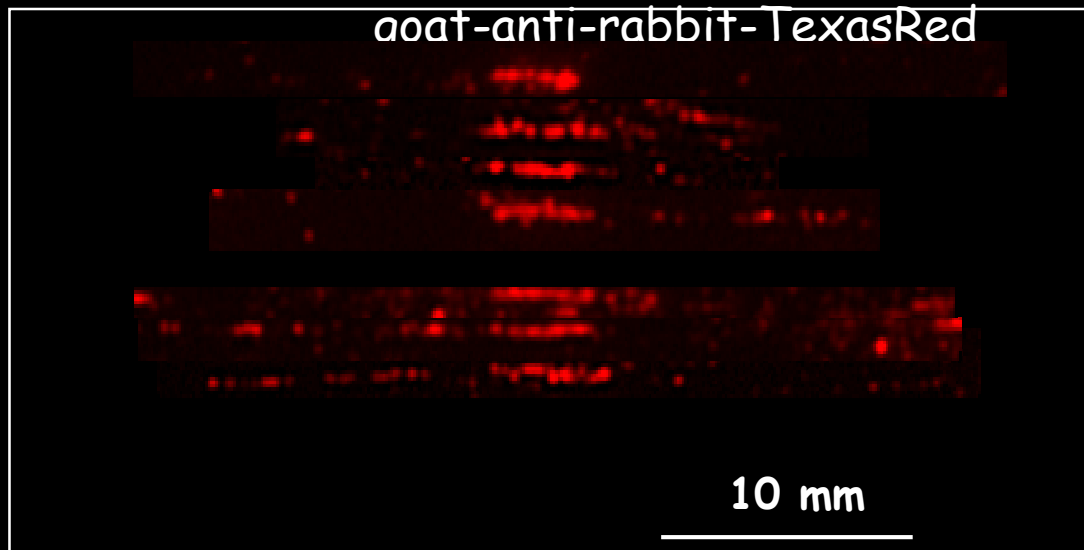
Próba: pHMW1Dx5 plasmid, insert 8,7 kb  
insert + vector: 11,386 kb

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            | 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

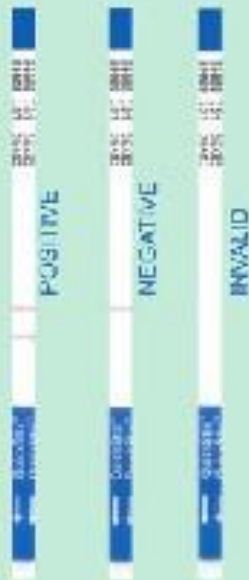
Cry2Ac

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**

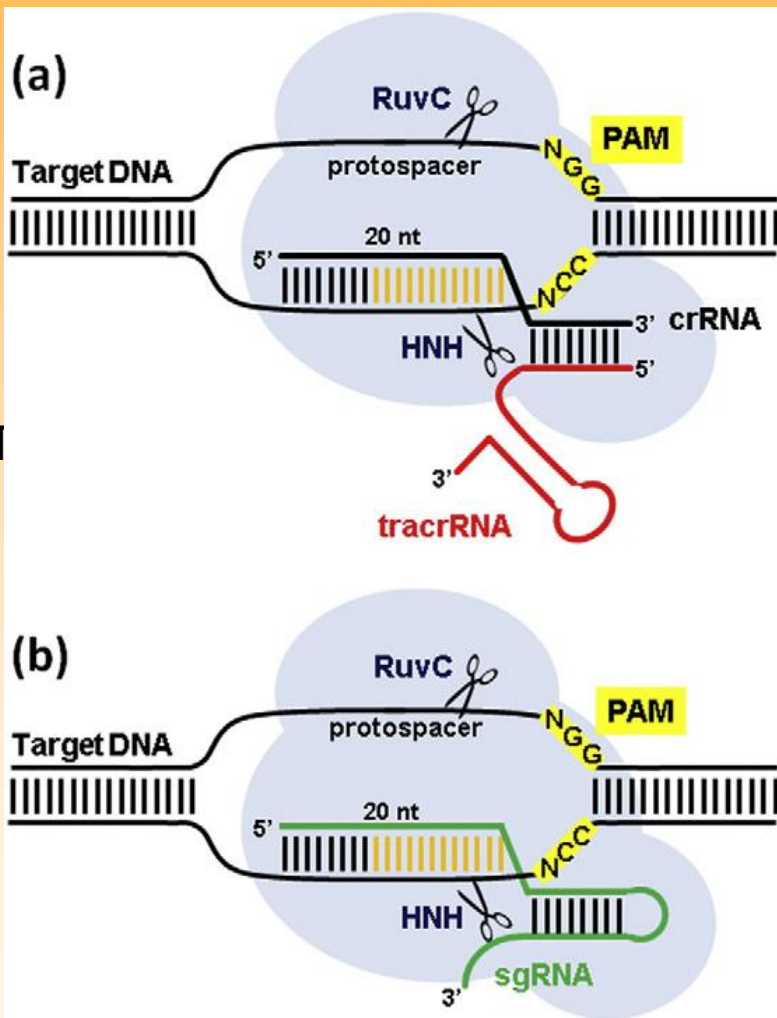
# Genomszerkesztés

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*)

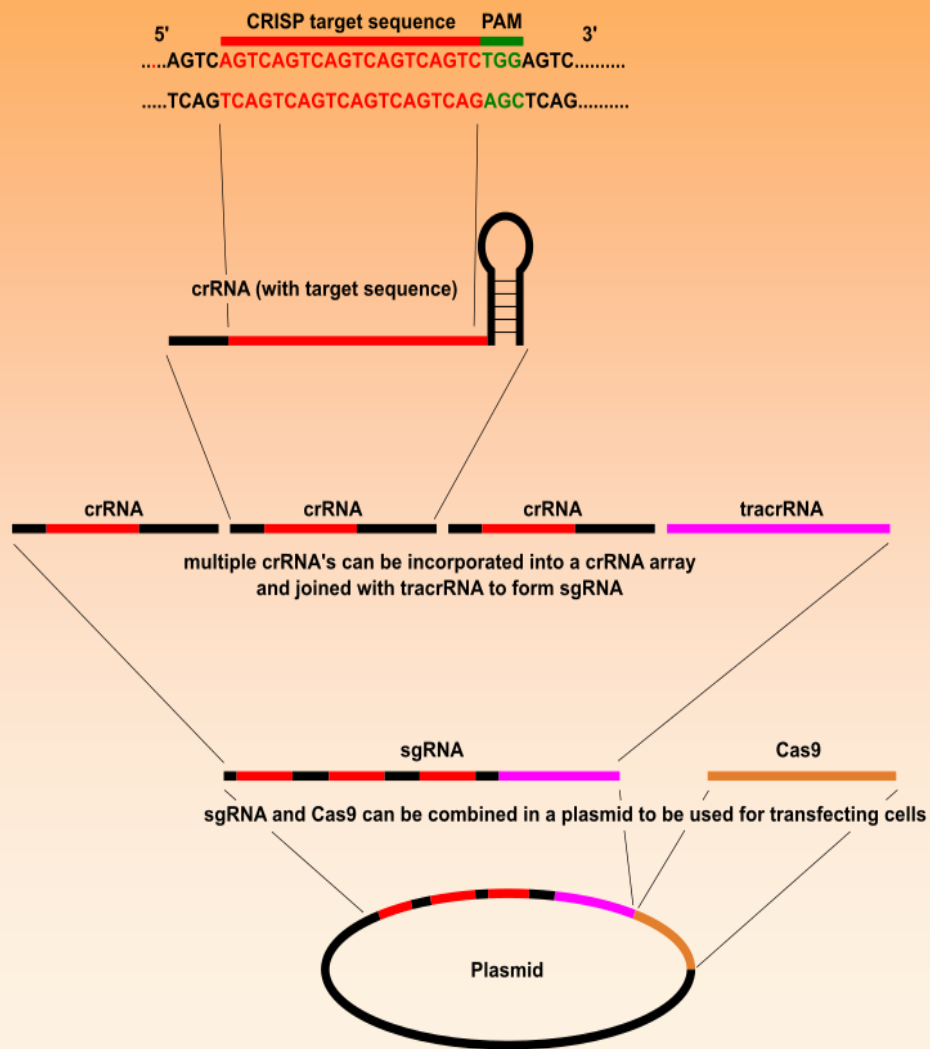
Cas9

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

javítótemplát

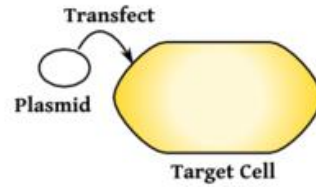
olyan DNS-szakasz, amely mintát mutat a sejt javítóenzimeinek és amelyik szekvenciája beépül az enzim által elvágott helyre

# CRISP-Cas9 AND GENOME EDITING

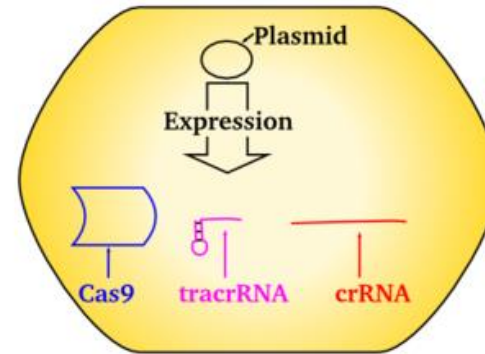


T

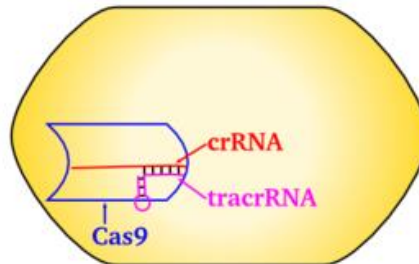
### 1: Transfection



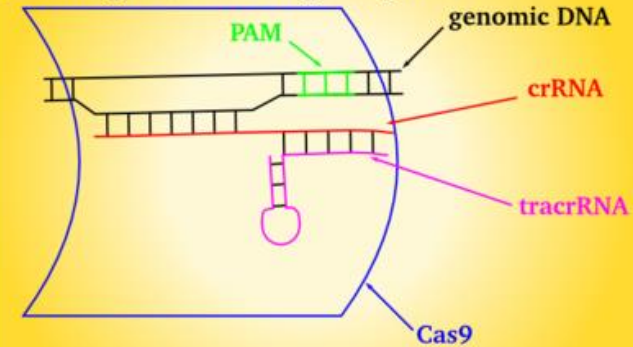
### 2: Expression of Plasmid



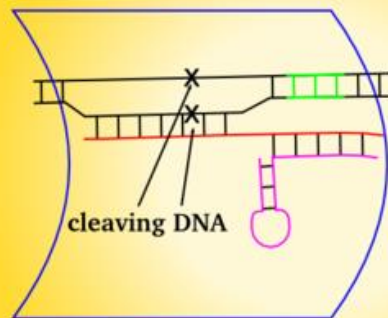
### 3: Activation of Cas9



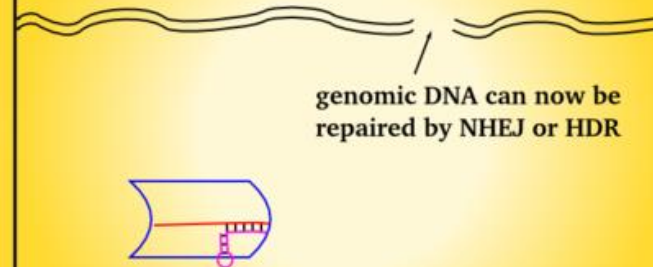
### 4: Binding to Genome Target Sequence



### 5: Cleaving Genomic DNA

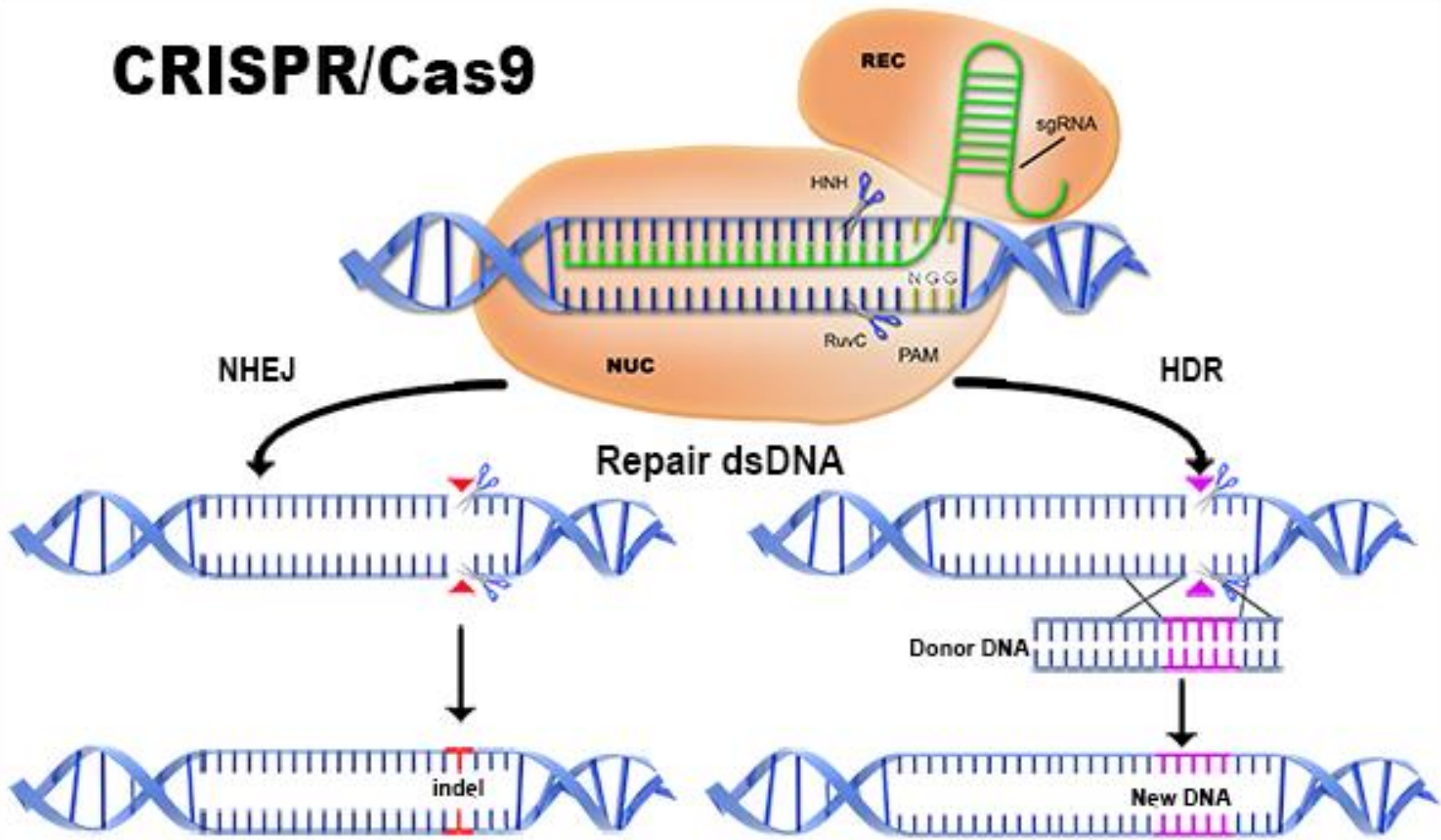


### 6: DNA is now ready for repair



T

# CRISPR/Cas9







Köszönöm a figyelmet!