

A dohány kloroplaszt transzformációs technika adaptálása Magyarországon

Oláh Judit – Balla Zoltán – Fári Miklós –
Miskei Márton

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma,
Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási
Kar, Kertészettudományi Intézet, Debrecen
ojud2@yahoo.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A GENOMNANOTECH Debrecen Regionális Egyetemi Tudásközpont (GND RET) keretében a DE AMTC Kertészettudományi Intézet, Növényi Biotechnológiai Tanszék, Növényi Molekuláris Genetikai Munkacsoportjának laboratóriumában 2007-ben kloroplaszt transzformációs kísérletek kezdődtek el.

A munkacsoport céljaként tűzte ki, hogy Magyarországon elsőként adaptálja a dohány kloroplaszt transzformációs technikát, amit már az Amerikai Egyesült Államokban (Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey) Prof. Maliga Pál vezetésével alkalmaznak. A program keretében több kutató ösztöndíjat nyert, hogy ezt a transzformációs technikát elsajátítsa, és a Debreceni Egyetemen sikeresen alkalmazza.

Kulcsszavak: GMO, kloroplaszt transzformálás, homológ rekombináció

SUMMARY

Under the GENOMNANOTECH Debrecen Regionális Egyetemi Tudásközpont (GND RET) research program in summer 2007 in UD Centre for Agricultural Sciences and Engineering Faculty of Agricultural Science Institute of Horticulture experiments were launched to transform tobacco plant by plastid transformation technics.

Our aim was to adopt first in Hungary the tobacco plastid transformation technics, which were used in Waksman Institute Rutgers, The state University of New Jersey (USA) leading with Prof Dr. Pál Maliga. Scientists won scholarships learn and use this technics in the University of Debrecen.

Keywords: GMO, plastid transformation, homologous recombination

BEVEZETÉS

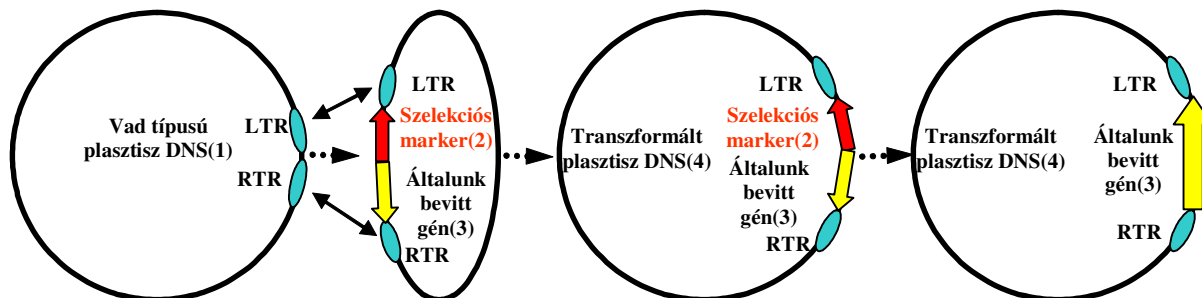
A kloroplaszt transzformálás jelentősége

Az első, magasabb rendű növényben (dohány) végzett sikeres kloroplasztisz transzformációt 1990-ben közölték (Svab et al., 1990). Az elmúlt másfél évtized eredményei előrevetítik a technológia elérhetővé és nélkülözhetetlenné válását gazdaságilag fontos növényfajokban.

A technológia fejlesztése és magyarországi bevezetése fontos, mivel a transzplasztómikus növények szántóföldi termesztése hatalmas előnyökkel jár. Ennek a bevezetésére már vannak próbálkozások a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Növényi Transzformációs Csoportjában Dr. Jenes Barnabás vezetésével, szintén Prof. Maliga Pál technológiája alapján. Ők rizs növényvel dolgoznak, ahol ez a technológia bonyolultabb.

A kloroplaszt transzformációval előállított növények mezőgazdasági és ipari alkalmazása számos gazdasági és ökológiai előnnyel bír a hagyományos GM növényekkel szemben. A kloroplasztiszban megvalósul a homológ rekombinációval történő irányított beépülés (1. ábra), nincs géncsendesítés, magas szintű fehérje expresszió érhető el, és kontrollálhatóvá válik a transzgén útvonala. Mivel nincs hibás beépülés, ezért nem ronthat el olyan géneket, melyek a növény fejlődését befolyásolják, illetve nem alakulnak ki hibás allergének. A kloroplaszt genomba való bejutásával a növény hasznos tulajdonságai, minősége nem módosul.

1. ábra: Transzgén bejuttatása a kloroplasztisz genomba



Forrás: Maliga, 2003

Figure 1: Transgenes intake into the chloroplast genome wild-type plastid DNA(1), selection marker(2), gene(3), transformed plastid DNA(4)

Fehérje termeltetés növényekkel

A növényrel termeltetett fehérje nagy mennyiségben és olcsón állítható elő. A növény genomja sokkal összetettebb, mint egy baktériumé vagy gombáé. A növényi sejtben számos chaperon segíti elő a fehérjék normális térszerkezetének kialakítását, valamint a megfelelő helyre való szállítást. A növényekben működő szekretorikus útvonalak alkalmasak arra, hogy a növényrel termeltetett fehérjét a sejtből ki tudjuk juttatni. A β -D-glükán exohidroláz és a 38kDa peroxidáz szignál peptidjei alkalmasak erre. Egy szignál peptid három régióból épül fel: az első az ún. N régió, ami pozitív töltésű aminosavakat tartalmaz, és ennek segítségével kötődik a fehérje a szignál felismerő részecskéhez (SRP), a második a H régió, ami hidrofób aminosavakat tartalmaz, és a membránba való beékelődéshez szükséges. A harmadik a C régió, ami általában kicsi, töltés nélküli aminosavakat tartalmaz, a proteáz ennél a résznél hasítja le a szignál peptidet a fehérjéről. A szignál működését legegyszerűbb tenyésztett szuszpenziós kallasz kultúrákban vizsgálni (Matsui et al., 2006).

TRANSZGÉN BEJUTTATÁSA GÉNPUKÁVAL

A kloroplaszt transzformációnak a legelterjedtebb módszere a génpuskával való transzformálás. A génpuska (2. ábra) használatakor transzformáló DNS-t volfram, vagy arany részecskékhöz kötik, ezt felcseppentik egy műanyag lövedékre, és vákuumban, nagy sebességgel csapódnak a részecskék a levélbe. A szövet egy kicsit roncsolódik, ezért regeneráltató táptalajra kell majd a levelet helyezni. Hatásfoka nem olyan nagy, mint a direkt DNS bevitelnél, és kiméra növények keletkeznek. Emiatt sorozatos szelekciós lépések után lehet előállítani teljesen transzgenikus növényt.

2. ábra: Génpuska

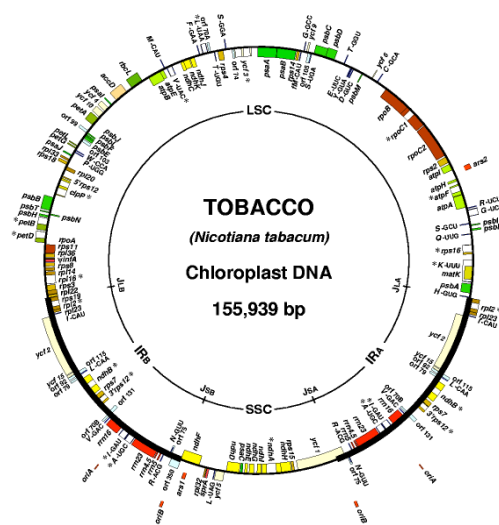


Figure 2: Genebooster

Munkánk során kiválasztottunk egy modell szervezetet (*Nicotiana tabacum*) és modell gént (PAF), amit transzformáltunk. Az elkészített PAF szekvenciákat tartalmazó kloroplaszt transzformációs vektort juttatjuk be dohány növénybe génpuska segítségével (Maliga, 2006; Svab et al., 1990). Szelekciós markerként a transzformáló vektorban az *aadA* gén van beépítve, amely streptomycin és spectinomycin rezisztenciáért felelős. Ezek az antibiotikumok a prokariótákra hatnak. Mivel az endoszimbionta elmélet alapján a kloroplasztisz prokarióta eredetű, ezért ezek az antibiotikumok azt elpusztítják. A kettős szelekció azért kell, mert a kloroplasztisz genomjában (3. ábra) a mutációs ráta lényegesen magasabb, mint a nukleáris genomban. Egyetlen pontmutáció is okozhat rezisztenciát egy antibiotikumra, de annak esélye, hogy mutáció révén mindkettőre rezisztens legyen, szinte a nullával egyenlő.

Mivel a kloroplaszt genom szekvenciája ismert, ezért megoldható, hogy a vektor homológ rekombinációval (1. ábra), általunk ismert helyre épüljön be.

3. ábra: Dohány (*Nicotiana tabacum*) kloroplasztisz genom géntérképe



Forrás: Maliga, 2006

Figure 3: Chloroplast DNA of tobacco (*Nicotiana tabacum*)

EREDMÉNYEK

Az előre előkészített lövedékeket, amelyek 0,7 μ m-es volfram részecskékre adszorbeálódott DNS-t tartalmaznak, sűrített levegő segítségével, vákuumban juttatjuk a növényi sejtekbe (4. ábra).

A vad típusú dohánynövényeket MS (Murashige-Skoog) táptalajon neveljük, steril körülmények között. Szaporításukat vegetatívan, a hajtás feldarabolásával végezzük. A megfelelő fejlődési stádiumban lévő növényekről a fiatalabb és zöldebb leveleket kell választani, mert koruknál fogva ezek szöveti felépítése kedvezőbb a lövéshez.

Idősebb, „erősebb” levelek lövésekor a volfram részecskék nehezebben juthatnak be a sejtekbe.

A növényekről levágott leveleket steril szűrőpapírral lefedett RMOP táptalajra helyezzük úgy, hogy az abaxiális (fonáki) felszíne nézzen felfelé (5. ábra).

4. ábra: Transzformálás génpuskával, és a regeneráció folyamata

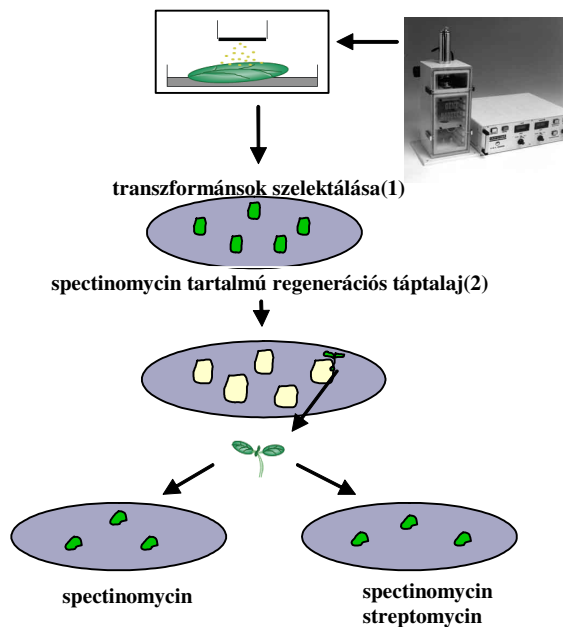


Figure 4: Transformation with genebooster and the regeneration selection of the transformed plants(1), regeneration media with spectinomycin(2)

5. ábra: RMOP táptalajra helyezett szűrőpapíron a lövésre előkészített levelek



Figure 5: Leaves ready for shoot on filter-paper on RMOP media

A lövéseket követően két napig hagyjuk pihenni a növényeket. Két nap múlva a leveleket 1x1 cm-es darabokra vágjuk, és antibiotikum tartalmú RMOP táptalajra helyezzük (6. ábra).

6. ábra: Spectinomycin-RMOP tartalmú táptalajra helyezett levélkorongok



Figure 6: Leafballs on Spectinomycin-RMOP media

Az antibiotikus táptalajon a regeneráció 8-12 hétig tart. A kinőtt hajtások száma töredéke a levélkorongok számának. Ennek az oka lehet, hogy a génpuska nem tökéletesen lövi meg a leveleket, nem minden egyes volfram részecske éri el a célját, azaz nem jut be a kloroplasztiszba.

A kis zöld hajtáskezdeményeket áthelyezzük kétféle antibiotikumot tartalmazó táptalajra, majd újabb regenerációs időszak következik, amelynek ideje szintén 8-12 hét. Ezzel a lépéssel lehet kiszelektálni a spontán mutánsokat. A kloroplasztisz genom mutációs rátája magas, ezért spontán mutációval is keletkezhet antibiotikum rezisztens növény. Amennyiben a kétféle antibiotikumot tartalmazó táptalajon is épek maradnak a növény kloroplasztiszai, szinte biztosra vehetjük, hogy a növény transzgenikus. A regenerációs idő alatt a 9. és 10. hét körül zöld hajtás jelenik meg a levélkorongokon, melyeknek képei a 7. ábrán láthatóak.

7. ábra: Transzformáció után spectinomycint és streptomycint együttesen tartalmazó táptalajon kinőtt dohányhajtások



Figure 7: Tobacco sprits after the transformation on spectinomycin and streptomycin-media

A megfelelő fejlettségi stádiumban lévő növényegyedekről mintát veszünk. A mintákból DNS kivonást végezzük. A kivont DNS-eket specifikus primerek hozzáadásával PCR technikával felszaporítjuk. Ezzel a technikával teszteljük, hogy a regenerálódott növény tartalmazza az általunk bevitt gént.

Tanszékünkön egy magyar fejlesztésű génpuskával dolgozunk, melynek beállítása, működésének optimalizálása feladataink közé tartozott.

Miután szekvenálással bizonyítást nyert, hogy a vad típusú dohánynövény (*Nicotiana tabacum*) a kloroplaszt transzformációs technika és az általunk előállított vektorkonstrukt alkalmazása mellett transzgenikusá vált, kijelenthetjük, hogy Magyarországon elsőként sikeresen adaptáltuk az Amerikai Egyesült Államokban (Waksman Institute Rutgers, The State University of New Jersey) Prof. Maliga Pál által kidolgozott dohány kloroplaszt transzformációs technikát. Ezzel teljesítettük a fő célkitűzésünket, amely magának a technikának az adaptációját és sikeres alkalmazását fogalmazta meg.

Amennyiben a kloroplaszt feltárás után bebizonyítjuk, hogy van benne fehérje, akkor következhet a távolabbi célok megfogalmazása, ami olyan fehérjék és vakcinák termeltetését jelenti, amiket szintén lehet kloroplasztisban termeltetni, ezen kívül olyan fehérje termeltetése, amelyek szükségesek nem fehérje természetű anyagok előállításához, közvetlenül a növényben vagy annak környezetében.

Biotechnológiai szempontból meg kell említeni, hogy ezzel a technikával nagy mennyiségben állítható elő fehérje, nincsenek káros hatásai, mivel a folyamat zárt rendszerben zajlik, későbbi engedélyeztetések után szabadföldi termesztésben való alkalmazása kiküszöböli a genomi transzformációnál fellépő pollen kijutást, mivel a kloroplaszt transzformációnál nem áll fenn a pollen transzmisszió.

Ha ez az engedélyeztetés sikerrel végbe megy, akkor talán a kloroplaszt transzformáció kiszoríthatja a genomi transzformációt. Bakteriális és gomba fermentációs technikákat kiválthatja gazdaságossága miatt.

Összességében elmondhatjuk, hogy távlati cél az iparilag (pl.: fehérjék vagy enzimek által előállított nem fehérje típusú vegyületek) és gyógyászatban (vakcinák, gyógyszer-molekulák) fontos alapanyagok nagy mennyiségben való előállítása.

DISZKUSSZIÓ

Az Amerikai Egyesült Államokban, 2005-2006-ban indított, Prof. Maliga Pál (Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey) által felügyelt és ellenőrzött „Molecular farming” kutatásba való bekapcsolódása a Debreceni Egyetem AMTC, Kertészettudományi Intézet, Növényi Biotechnológiai Tanszék, Növényi Molekuláris Genetikai Munkacsoportjának 2007-ben sikeresen megtörtént a GENOMNANOTECH Debrecen Regionális Egyetemi Tudásközponttal (GND RET) együttműködve. Munkacsoportunk elsődleges célként tűzte ki, hogy Magyarországon elsőként adaptálja a dohány kloroplaszt transzformációs technikát. Jelenleg ebből a munkából a Debreceni Egyetem Mezőgazdaságtudományi Karán tartott Tudományos Diákköri Konferencián első helyezett pályamunka született Balla Zoltán szakdolgozónk által.

A növényrel termeltetett fehérje nagy mennyiségben és olcsón állítható elő. Ezek a modell szervezetek nem jelentenek kockázatot a humán vonatkozásban, mivel az allergének kialakulásának esélye minimális. Nem szükségesek hozzá különféle technikai feltételek, mint például fermentor.

Reméljük, munkánkkal elterjeszthetjük Magyarországon is ezt az új transzformációs technikát, amely az előnyei miatt a GM növények helyes megítélésében is segíthet.

IRODALOM

Maliga, P. (2003): Progress towards commercialization of plastid transformation technology. Trends Biotechnol. 2003 Jan.; 21. 1: 20-8.
Maliga, P. (2006): Plastids – Evolution, Genomes, Genes & Regulation of Gene Expression Plant Molecular Biology. 16. 765: 513.

Matsui, T.-Hori, M.-Shizawa, N.-Nakayama, H.-Shinmyo, A.-Yoshida, K. (2006): High efficiency secretory production of peroxidase C1a using vesicular transport engineering in transgenic tobacco. Journal of Bioscience and Bioengineering, 102. 2: 102-109.
Svab, Z.-Hajdukiewicz, P.-Maliga, P. (1990): Stable transformation of plastids in higher plants. USA. 1990 Nov. Proc. Natl. Acad. Sci. 87. 21: 8526-8530.