

ROVATVEZETŐ:

Dr. Heszky László *akadémikus*



Az előző III./1. részben, a transzgénikus (GM) fajta nemesítése folyamatának első lépéseként bizonyítottuk, hogy a transzgén a géntranszfert követően a regenerált növény minden sejtjében jelen van. Ebben a részben azt kell bizonyítanunk, hogy az integrálódott transzgén működik a növény sejtjeiben, és ivaros úton öröklődik az utódokba. Ezekre a tesztekre azért van szükség, mert csak a stabilan integrálódott és megfelelően működő transzgéneket tartalmazó növények szolgálhatnak megbízható forrásul a transzgénikus (GM) fajta előállításához.

Tanuljunk „géntechnológiául” (12.)

A transzgénikus (GM) fajta előállítása (III./2.)

A transzgén működésének és öröklődésének bizonyítása

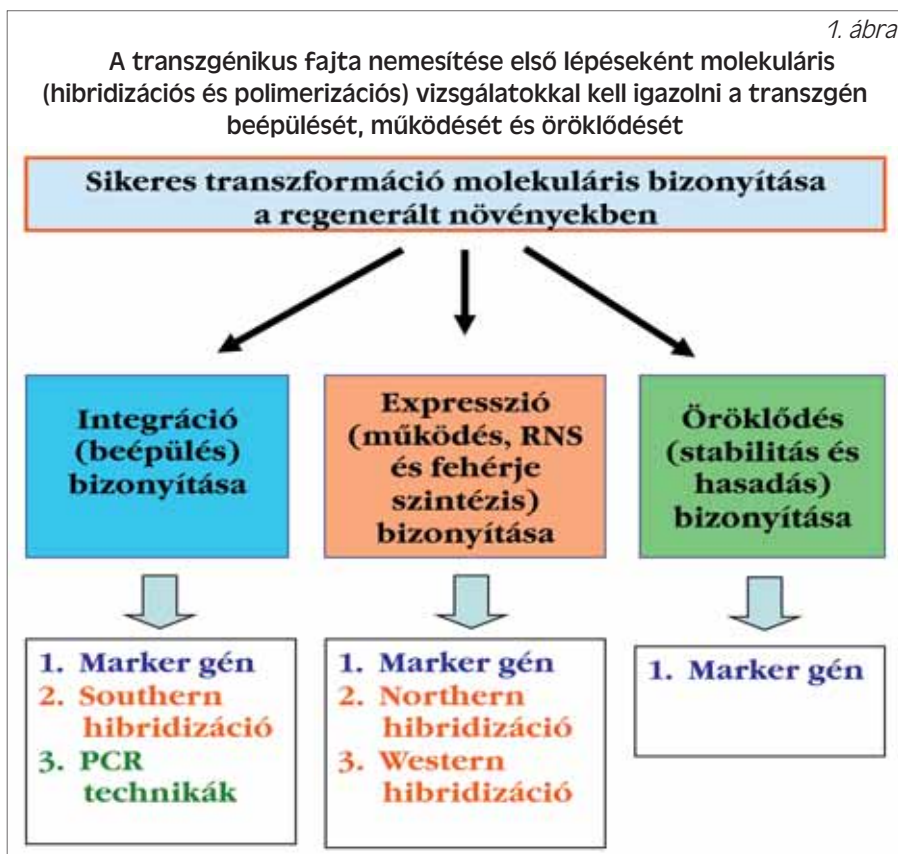
Dr. Heszky László

SzIE Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Genetika és Biotechnológiai Intézet, Gödöllő

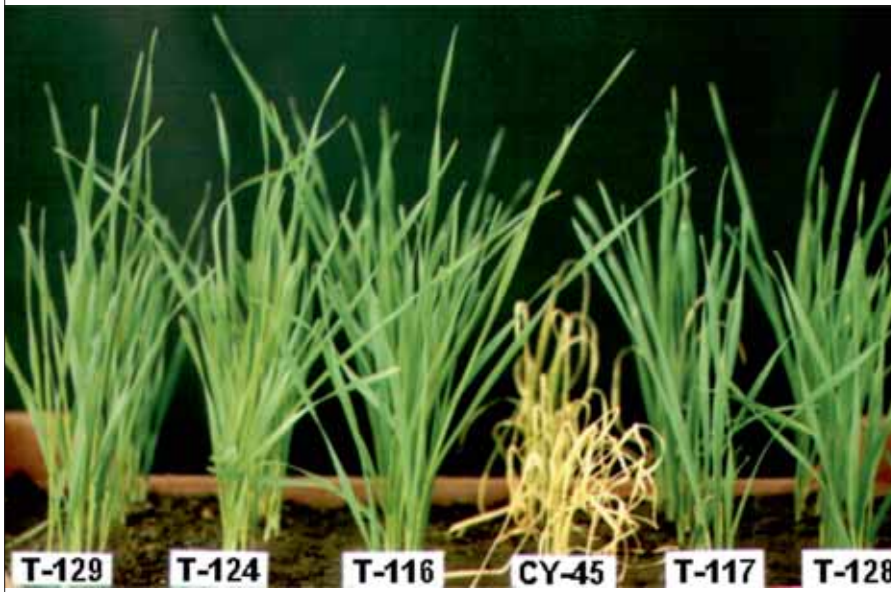
A géntranszfert követően a regenerált növényekben először közvetett módon, a markergénre történő szelekcióval, majd molekuláris módszerekkel közvetlenül is bizonyítható a transzgén működése (1. ábra).

A működés közvetett bizonyítása a markergénnel

A gazdasági célú vektor konstrukciókban a szelektálható markergén a foszfinotricin-acetil-transzferáz enzimet kódoló *pat* gén, mely a kereskedelmi forgalomban kapható FINALE herbiciddel szemben biztosít rezisztenciát. A túlélő sejtekből regenerált zöld növények (lásd. 11. részben 4/A. és 6/A. ábrát, Agrofórum, 2011. május) előzetes tesztelésének kézenfekvő módja, hogy azokat is a FINALE herbiciddel permetezzük le. A permetezést követően a nem transzgénikus nö-



2. ábra
 Transzgenikus búzatörzsek rezisztensek a *glufozinát-ammonium* hatóanyagú (Finale) herbiciddel szemben, míg a kontroll fajta (CY-45) a permetezést követően elpusztul (Pauk J. és mts. kísérlete; GK Kft., Szeged)



vények kifehérednek, a markergént tartalmazók pedig zöldek maradnak, de csak akkor, ha a markergén működik a növény sejtjeiben (2. ábra). Ez azonban csak közvetett bizonyítéknak tekinthető.

Molekuláris módszerekkel közvetlenül, a transzgenről szintetizálódó mRNS és fehérje megjelenésével is igazolni kell, a transzgen, pontosabban a gazdaságilag jelentős gén expresszióját (működését).

A működés molekuláris bizonyítása

A transzgen működése azt jelenti, hogy a DNS-ről van mRNS szintézis (átírás vagy transzkripció), és a mRNS-ről folyamatos a fehérjeszintézis (átfordítás vagy transláció). Ezeknek a folyamatoknak a bemutatását lásd a sorozat 3. részében a 2. és 3. ábrákon (Agrofórum, 2010. szeptember).

Végeredményben a transzgen működése molekulárisan bizonyítható a transzgenspecifikus mRNS és a transzgen által kódolt fehérje kimutatásával a GM-növényből vett mintában. A transzgenspecifikus mRNS kimutatásának módszere a Northern hibridizáció, a transzgen által kódolt fehérje kimutatás technikája pedig a Western hibridizáció.

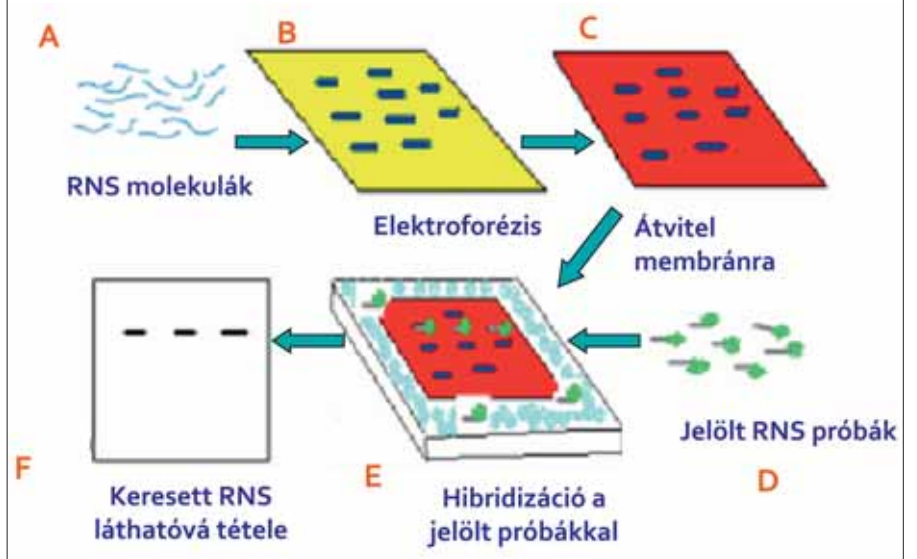
Northern hibridizáció

Northern hibridizáció az RNS azonosítás módszere. RNS-DNS hibridizáción alapuló módszer, mely alkalmas a transzgen működésének bizonyítására azáltal, hogy a növényi RNS mintában lehetővé teszi a transzgenspecifikus (transzgenről szintetizálódó) RNS-ek azonosítását. A folyamat és an-

nak egyes lépései nagyon hasonlítanak a transzgen integrációja bizonyításakor, a transzgenspecifikus DNS azonosításnál részletesen bemutatott Southern hibridizációra (lásd a sorozat 11. részében a 3. ábrán, Agrofórum, 2011. április). A különbség annyi, hogy ebben az esetben nem DNS-DNS, hanem RNS-DNS alapú azonosításról van szó.

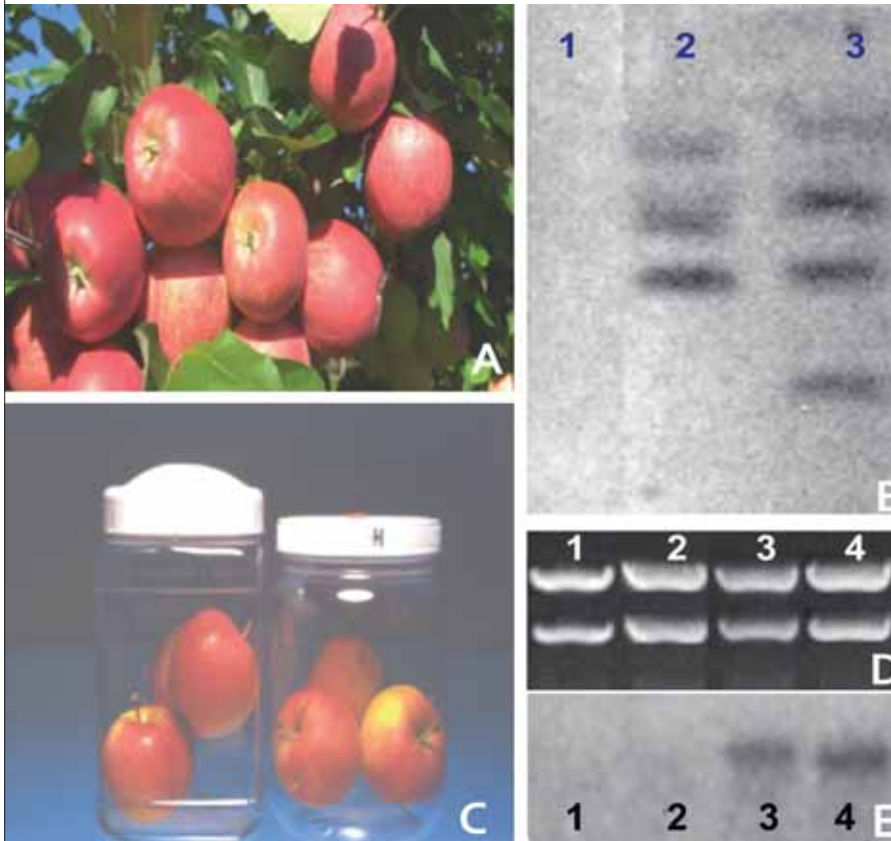
A transzgen működésének bizonyítása Northern hibridizációval (3. és 4./C.-E. ábrák): A vizsgált transzgenikus növény mintájából RNS-t izolálunk. A háromféle RNS-t (rRNS, tRNS, mRNS) tartalmazó mintából, csak az mRNS használható fel azonosításra. A kapott mRNS mintában is több ezerféle mRNS van, hiszen a sejtekben egy időben több ezer gén van bekapcsolt állapotban (3.A. ábra). Ebben a heterogén mRNS populációban kell megtalálni és kimutatni a transzgenspecifikus mRNS-t. A heterogén RNS populáció tagjait ezért először elektroforetikus (lásd. az előző, 11. részben a 2. ábrán Agrofórum, 2011. április) kell szétválasztani (3.B. ábra), majd a gélről membránra (filterre) átvinni (3.C. ábra).

3. ábra
 A transzgen működésének (átírás, transzkripció) bizonyítása Northern hibridizációval. A növényből izolált heterogén mRNS molekulákat (A) elektroforézissel, méret alapján szétválasztjuk (B). A gélről az RNS molekulákat blottolással átvisszük a membránra (C), ahol transzgenspecifikus szekvenciájú RNS próbával (D) hibridizáltatjuk (E). A jelölt próba csak a transzgenspecifikus RNS-sel fog hibridizálni és az RNS próba jelölése miatt autoradiográfiával, vagy kemilumineszcenciával vizualizálható (F). (wiki.cstl.semo.edu alapján)



4. ábra

A: Termőre fordult, érésben gátolt transzgenikus almafa a Cornell Egyetem (USA) tenyészertjében (Kiss E. és Calli Zs. kísérlete, SZIE, Gödöllő)
B: Az integrálódott transzgén kópiaszámának meghatározása Southern hibridizációval. B1: nem transzformált kontroll, B2: transzgenikus fa 3 kópiával, B3: transzgenikus fa 4 kópiával.
C: GM gyümölcsökben az etilétermelést gátló transzgén működésének vizsgálata Northern hibridizációval.
D1-4: A kontroll fák gyümölcsseiben (RNS kontroll) a gén a virágzást követően folyamatosan működik.
E: a transzgenikus fák gyümölcsseiben a gén csak a szüretet követően kapcsol be. (Mintavételek időpontja: 1: jún. 15., 2: aug. 15., 3: szept. 15., 4: szept. 17.)



A hibridizációs próba a transzgén által kódolt mRNA szekvenciájának megfelelő automatában szintetizált egyszálas cDNS (copy DNS), mely az mRNA-hez hasonlóan nem tartalmaz intront. A membránra átvitt szétválasztott mRNA populációt radioaktívan jelölt (3/D. ábra) - a keresett mRNA-re specifikus egyszálas cDNS próbával hibridizáltatjuk (3/E. ábra), majd autoradiográfiával azonosítjuk a hibridizált foltnak megfelelő RNS-t tartalmazó sávot (3/F. ábra). Amennyiben a növényi mintában jelen volt a transzgénről szintetizálódott mRNA, akkor az hibridizált a vele komplementer egyszálas cDNS próbával (4/C-E. ábra). A Southern blothoz hasonlóan, lehetőség van a cDNS kémiai jelölé-

sére is (pl. biotinnal, digoxigeninnel stb.). Ebben az esetben a detektálás színreakciók, fluoreszcencia stb. alapján történik. Összefoglalva, tehát ha a röntgenfilmen sávot kapunk, akkor a vizsgált növényi RNS minta tartalmazza a transzgén átírása során szintetizálódó mRNA-t, mert létrejött az mRNA-cDNS hibridizáció (4/E. ábra). Ez pedig közvetlen bizonyítéka a transzgén működésének, az átírásnak, vagy más néven transzkripciónak. A transzgenikus növényben, illetve annak vizsgált szövetében tehát a transzgén működik. Abban az esetben viszont, ha nem kapunk jelet, az azt bizonyítja, hogy a vizsgált növényből izolált mRNA minta nem tartalmazza a

transzgenspecifikus mRNA-t és ezért, nem jöhetett létre az mRNA-cDNS hibridizáció. A vizsgált GM-növényben, vagy annak vizsgált szövetében a transzgén nem működik.

Western hibridizáció

Western hibridizáció a fehérjeazonosítás módszere. Antigén-antitest (fehérje-fehérje) reakción alapuló módszer, mely alkalmas a transzgén működésének (fehérjeszintézis) bizonyítására. A módszer antigén-antitest (immun) reakcióval, a transzgén fehérje termékének, mint antigénnek azonosítását teszi lehetővé.

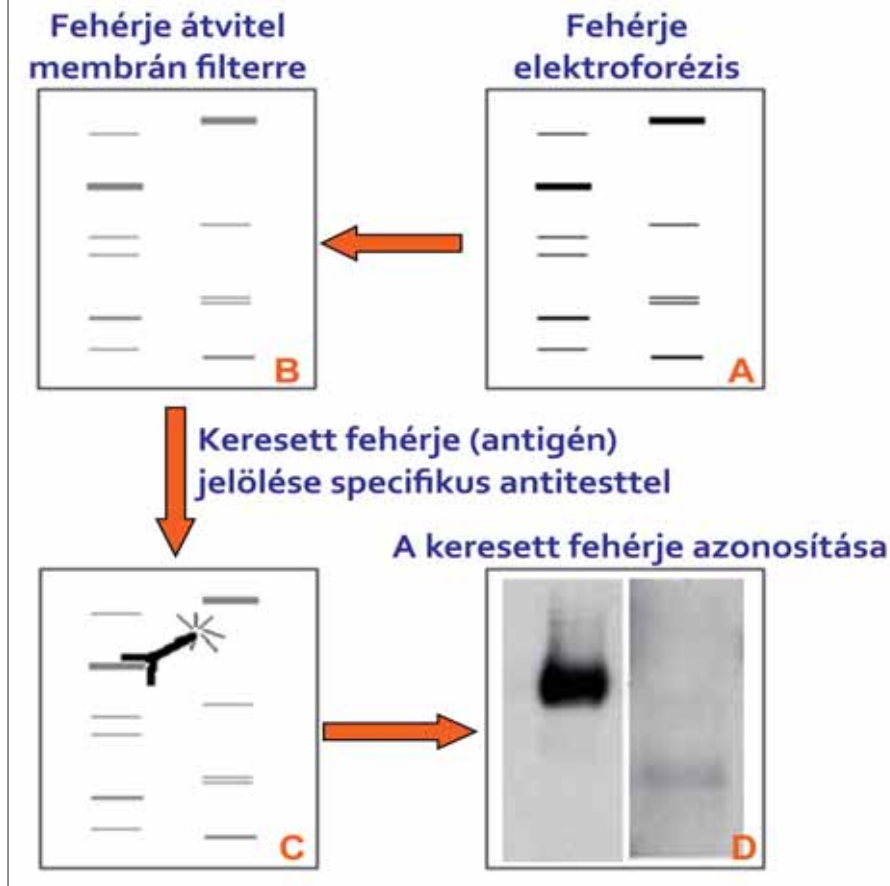
A transzgén működésének bizonyítása Western hibridizációval (5. ábra): A vizsgált transzgenikus növény mintájából fehérjét izolálunk. A minta, az RNS-hez hasonlóan - mivel a sejtekben egy időben sok gén működik - sokféle fehérjét tartalmaz. Ezek közül egy az, ami a transzgén termékének tekinthető. Ezt kell megkeresni és jelenlétét kimutatni. A fehérjemintát első lépésben SDS polyakrilamid gélen elektroforetikusán szétválasztjuk, majd membránra (pl. nitrocellulóz filter) blotoljuk.

A keresett fehérjére, mint antigénre specifikus jelölt antitestet juttatnak a filterre. Az antigén-antitest komplex kialakulása bizonyítja a keresett fehérje jelenlétét a mintában. A módszer tehát alkalmas arra, hogy a transzgén által kódolt fehérje jelenlétét kimutassa a transzgenikus növényből vett mintában. Ezzel közvetlenül bizonyítjuk a transzgén expresszióját, pontosabban a translációt, a gén által kódolt fehérje szintézisét.

A módszer specialitását az adja, hogy a transzgén által kódolt tisztított fehérjével kell rendelkezünk. Ezt a fehérjét, mint antigént, be kell juttatni egy emlősbe (pl. nyúl), aminek szervezete ellenanyagot (antitestet) termel a fehérjével mint antigénnel szemben. Az antitest rendkívül specifikus az antigén fehérjére, ezért szelektíven ahhoz kapcsolódik. A nyúlban termelődött antitest lesz a hibridizációs próba, melyet kémiai jelölnek (pl. biotin). A blotolást után, az antigén-

5. ábra

A transzgén működésének (átfordítás, transzláció) kimutatása Western hibridizációval. A növényből izolált heterogén fehérjemolekulákat (A) elektroforézissel méret alapján szétválasztjuk (B). A gélről a fehérje molekulákat blottolással átvisszük membránra (C), ahol transzgén által kódolt fehérjére, mint antigénre specifikus jelölt antitesttel (D) „hibridizáljuk” (E). Az jelölt antitest a transzgén specifikus fehérjéhez fog kapcsolódni (antigén-antitest reakció) és ez a fehérje az antitest jelölése miatt autoradiográfiával vagy kemilumineszcenciával vizualizálható (F). (bio.davidson.edu alapján)



antitest reakciót követő elszíneződés a membránon (vagy oldatban) bizonyítja a gén működését a transzgenikus növényben.

Összefoglalva, tehát ha a membránon jelet kapunk, akkor a vizsgált növényi fehérje mintája tartalmazza a transzgén által kódolt fehérjét, mert létrejött az antigén-antitest reakció. Ez pedig közvetlen bizonyítéka a transzgén működésének az átfordításnak, vagy transzlációnak. A vizsgált transzgenikus növényben, illetve annak vizsgált szövetében tehát a transzgén működik.

Abban az esetben viszont, ha nem kapunk jelet, az azt bizonyítja, hogy a vizsgált növényből izolált fehérjeminta nem tartalmazza a transzgén által kódolt fehérjét, és ezért nem jöhetett létre az antigén-antitest reakció. A GM-növényben vagy annak

vizsgált szövetében tehát a transzgén nem működik.

A transzgén öröklődésének bizonyítása markergénnel

A szelektálható markergéneket és funkciójukat, a sorozat 7. részében mutattuk be (2. ábra, 1. kép, Agrofórum, 2011. január). Bizonyítottuk, hogy kiválóan alkalmasak a géntranszfert követően a transzgenikus sejtek, tenyészetek szelektációjára, sőt a szelektált sejtekből regenerált növényekben a transzgén működésének közvetett bizonyítására (2. ábra). Ezekon kívül kiválóan használható a transzgén öröklődésének bizonyítására is.

A transzgén öröklődése bizonyításának legegyszerűbb módja, ha a GM-növényt öntermékenyítjük,

és az így kapott magvakat herbicides táptalajon csíráztatjuk. Olyan herbicidet kell alkalmaznunk, melyre a markergén rezisztenciát biztosít. Az utódgeneráció azon egyedei, melyek nem tartalmazzák a transzgént és vele együtt a herbicid-rezisztenciát biztosító markergént, ki fognak fehéredni. Ezzel szemben azok a csíranövények, melyek genomjában jelen van a transzgén és ahhoz kapcsolva a rezisztenciát biztosító markergén is, zöldek maradnak és tovább fejlődnek.

Abban az esetben, ha minden csíranövény kifehéredik, az azt bizonyítja, hogy a transzgén nem működik. Ezt a jelenséget géncsendesítésnek (gene silencing) nevezzük, aminek tényleges kiváltó okaira jelenleg még csak hipotézisek vannak.

Abban az esetben, ha az öntermékenyítés után a csíranövények 100%-ban zöldek maradnak, az azt bizonyítja, hogy a vizsgált GM-növény homozigóta a transzgénre nézve, ezért a rezisztencia, mint tulajdonság, az utódokban nem hasad.

Abban az esetben, ha zöld és albínó növényeket is kapunk, az azt bizonyítja, hogy a vizsgált GM-növény heterozigóta a transzgénre nézve, ezért a rezisztencia, mint tulajdonság az utódokban hasad (6. ábra). A zöld (rezisztens) és kifehéredő (szenzitív) növények számának alakulásából a hasadási arányra is következtethetünk.

Természetesen a transzgén expresszióját és annak mértékét, továbbá a fenti öröklődési arányokat jelentősen befolyásolhatják az adott faj ploidia viszonyai, az integrálódott transzgének száma és az integráció kromoszómális lokalizációja stb. Ezekkel most nem foglalkozunk, de a GM-fajta előállítása során ezekre a problémákra részben még visszatérünk. ■