

DEBRECENI EGYETEM

AGRÁRTUDOMÁNYI
KÖZLEMÉNYEK **42.**

ACTA AGRARIA DEBRECENIENSIS

2010



TARTALOM		CONTENTS	
	Oldal		Page
Kerpely Kálmán Doktori Iskola	5	Doctoral School Kerpely Kálmán	5
<i>Antal József – Grasselli Gábor: Energetikai faültetvények elterjedésének vizsgálata – térségfejlesztési és munkahelyteremtési lehetőségek</i>	<i>7</i>	<i>József Antal – Gábor Grasselli: Survey on energetic short rotation forestry systems – Possibilities of spatial development and job creation</i>	<i>7</i>
<i>Balla Barbara – Fazekas Mónika – Lakatos Péter – Abonyi Ferenc – Holb Imre: Csökkentett permetezési programok hatása az alma jelentősebb gombakórokozóira környezetkímélő termesztési rendszerekben</i>	<i>13</i>	<i>Barbara Balla – Mónika Fazekas – Péter Lakatos – Ferenc Abonyi – Imre Holb: The effect of reduced sprinkler programs on the main fungal pathogens of apple in environmentally sound production systems</i>	<i>13</i>
<i>Csizmarik Gábor – Juhász Csaba: Eltérő víztestek és üledékeik összehasonlító vizsgálata</i>	<i>17</i>	<i>Gábor Csizmarik – Csaba Juhász: Comparative Study on Different Water Bodies and their Sediments</i>	<i>17</i>
<i>Erdei Éva – Pócsi István – Molnár Mónika – Gyémánt Gyöngyi – Nagy János: Konverziós ráta értékek meghatározása a <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS712 gomba törzs etanol termelésének jellemzéséhez</i>	<i>23</i>	<i>Éva Erdei – István Pócsi – Mónika Molnár – Gyöngyi Gyémánt – János Nagy: Determination of conversion rate values to characterise the ethanol production of the <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS712 fungus branch</i>	<i>23</i>
<i>Hunyadi Gergely: Komposzt keverési-arány meghatározásának módszertani kidolgozása</i>	<i>29</i>	<i>Gergely Hunyadi: Methodological development of the determination of the compost mixture ratio</i>	<i>29</i>
<i>Kiss Csongor Gábor: Fototróf mikroorganizmusok energiatermelési rendszerei (a fotobioreaktorok csoportosítása)</i>	<i>35</i>	<i>Csongor Gábor Kiss: Energy production systems of phototroph microorganisms (classification of photobioreactors)</i>	<i>35</i>
<i>Mező Barna: Településszerkezet, területhasználat és a roma szegregációs folyamatok kapcsolata Hajdúböszörményben</i>	<i>41</i>	<i>Barna Mező: Connections between settlement structure, land use and the process of gypsy segregation in Hajdúböszörmény</i>	<i>41</i>
<i>Mézes Lili: A vágóhídról származó baromfi toll fizikai és kémiai kezelése</i>	<i>51</i>	<i>Lili Mézes: Physical and chemical treatment of poultry feather from the slaughter-house</i>	<i>51</i>
<i>Micskei Péter: Hálózatok és klaszterek szerepe a vidékfejlesztésben</i>	<i>57</i>	<i>Péter Micskei: The role of networks and clusters in rural development</i>	<i>57</i>
<i>Mocsáriné Fricz Julianna – Juhász Csaba: A környezetgazdálkodási agrármérnöki BSc alapképzési szak kompetenciaprofiljának értékelése</i>	<i>63</i>	<i>Julianna M. Fricz – Csaba Juhász: Validation of the competence profile of agri-environmental engineering bachelor course</i>	<i>63</i>
<i>Oláh Judit – Balla Zoltán – Fári Miklós – Miskei Márton: A dohány kloroplaszt transzformációs technika adaptálása Magyarországon</i>	<i>73</i>	<i>Judit Oláh – Zoltán Balla – Miklós Fári – Márton Miskei: Adopt the tobacco plastid transformation technics in Hungary</i>	<i>73</i>
<i>Oláh Judit – Balla Zoltán – Fári Miklós – Miskei Márton: <i>Penicillium chrysogenum</i> antifungális fehérje (PAF) termeltetése transzgenikus dohány (<i>Nicotiana tabacum</i>) növényben</i>	<i>77</i>	<i>Judit Oláh – Zoltán Balla – Miklós Fári – Márton Miskei: <i>Penicillium chrysogenum</i> antifungal protein (PAF) production in transgenic tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i>) plant</i>	<i>77</i>
<i>Sipos Marianna: A kukorica (<i>Zea mays</i> L.) magnézium-felvételi dinamikája mezőszégi talajon</i>	<i>83</i>	<i>Marianna Sipos: Magnesium uptake dynamism of maize (<i>Zea mays</i> L.) on prairie soil</i>	<i>83</i>
<i>Szántó Zsuzsanna – Sinóros-Szabó Botond: Harmonikus fejlődés és a biodízel</i>	<i>91</i>	<i>Zsuzsanna Szántó – Botond Sinóros-Szabó: Harmonic development and biodiesel</i>	<i>91</i>
<i>Szöllősi Nikolett – Juhász Csaba – Kovács Györgyi – Zsembeli József: A növényborítás hatása a talaj CO₂ emissziójának napi dinamikájára</i>	<i>97</i>	<i>Nikolett Szöllősi – Csaba Juhász – Györgyi Kovács – József Zsembeli: The effect of crop coverage on the daily dynamism of the soil's CO₂ emission</i>	<i>97</i>

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 transzgenikussá 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 szükségese 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 természetben való alkalmazása kiküszöböli a genomi transzformációnál fellépő pollen kijutást, mivel a kloroplaszt tanformációnál nem áll fenn a pollen transzmisszió.

Ha ez az engedélyeztetés sikerrel végbe megy, akkor talán a kloroplaszt transzformáció kizoríthatja 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 gyógyszerészetben (vakcinák, gyógyszermolekulák) 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 növényvel 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.

Penicillium chrysogenum antifungális fehérje (PAF) termeltetése transzgenikus dohány (*Nicotiana tabacum*) növényben

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 RET – Regionális Tudásközpont – „Molecular farming” program (gyógyszer molekulák előállítása transzgenikus növényekkel) keretében 2007-ben PAF antifungális proteinnel transzformált dohány növény előállítási kísérletek indultak meg a DE AMTC Kertészettudományi és Növényi Biotechnológiai Intézetben. A cél a transzformációs módszerek elsajátítása volt. Ehhez egy modell szervezetet (*Nicotiana tabacum*) és egy modell fehérjét (PAF) választottunk.

Munkánk során a paf gént különböző vektorkonstrukciókban dohánynövénybe transzformáltuk nukleáris és kloroplaszt transzformációs technikával, majd DNS, RNS és fehérje szinten kimutattuk a transzgen jelenlétét, amit PCR technikával és szekvenálással igazoltunk.

Kulcsszavak: GMO, PAF, *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium tumefaciens*, nukleáris transzformálás, kloroplaszt transzformálás

SUMMARY

Under the „Molecular farming” research program (product vaccines and substances for medical use with gene manipulated plant) in 2007 in UD Centre for Agricultural Sciences and Engineering Faculty of Agricultural Science Institute of Horticulture Department of Plant Biotechnology experiments were launched to transform tobacco plant by PAF antifungal protein. Our aim was to learn the transformation technics. We chose the *Nicotiana tabacum* and PAF as model systems.

Our work was to express several different paf constructions in plants with nuclear and plastid transformation too. After that we confirmed the presence of paf gene in the level of DNA and RNA.

Keywords: GMO, PAF, *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium tumefaciens*, nuclear transformation, plastid transformation

BEVEZETÉS

A munkacsoportunk célként tűzte ki, hogy Magyarországon 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. Emellett célunk volt, hogy sikeresen alkalmazzuk a Debreceni Egyetemen a nukleáris transzformációs technikákat. Munkánk során modellnövényként a dohányt (*Nicotiana tabacum*) választottuk. Transzgenként egy antifungális hatású *Penicillium chrysogenum* gomba fehérjét (PAF) használtuk.

Penicillium chrysogenum antifungális fehérje (PAF)

PAF (Penicillium Antifungal Protein) egy kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag bázikus antimikrobiális protein, mely nagy mennyiségben választódik ki a *Penicillium chrysogenum* fonalas gomba által (Marx et al., 1995). A PAF gátolja több gazdaságilag jelentős növény- és állat patogén fonalas gomba növekedését (pl. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma koningii*). Ezekben a gombafajokban oxidatív stressz keletkezik a PAF fehérje hatására, ezen túl rendellenes hifák alakulnak ki, és gátolt a szaporodás, azonban nem mutat semmilyen hatást élesztőkön és baktériumokon (Kaiserer et al., 2003). A PAF az érzékeny gombákban K⁺-effluxot (10 µg/ml PAF esetén), reaktív oxigénformák (ROS) akkumulálódását és csökkent metabolikus aktivitást eredményez (Kaiserer et al., 2003). Ugyanakkor hasonlóan más antimikrobiális fehérjékhez, a PAF káros hatása látványosan kivédhető kationok jelenlétében (pl. Mg²⁺, K⁺ és Na⁺). Immunfluoreszcens festéssel kimutatták, hogy a PAF bejutása aktív transzporttal, endocitózissal történik, amely megakadályozható a légzési lánc gátlásával, konkrétan a KCN és NaN₃ alkalmazásával (Oberparleiter et al., 2003).

A PAF fehérjét 276 bázispárból álló gén kódolja. A PAF egy 18 aminosavból álló proszekvenciát, 19 aminosavból álló „mature” szekvenciát tartalmaz. A proszekvencia a PAF extracelluláris térbe jutásáért, a proszekvencia pedig a fehérje normális térszerkezetének kialakításáért, míg a „mature” szekvencia a PAF tulajdonságaiért felelős (Kaiserer et al., 2003; Marx et al., 2005). Az 1. ábrán látható PAF szerkezete.

1. ábra: A PAF génszerkezete

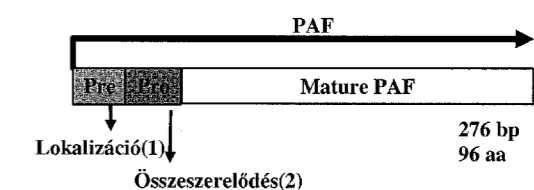


Figure 1: PAF gene structure
 Localization(1), Folding(2)

Nukleáris transzformáció

Nukleáris transzformációt több módszerrel is lehet végezni, a legelterjedtebb az *Agrobacterium*-mal történő transzformálás. Ez a természetben is előforduló baktérium a citoplazmájában hordozott plazmidon kódolt génekkel tumor képződést indukál a növényeken (Matthysse és Stunp, 1976). A baktériumok patogenitása a tumorindukáló (Ti) plazmiddal függ össze. A Ti plazmid T-DNS része a transzformálás során átkerül a növényi sejtbe, és a sejt DNS-állományába integrálódik. A T-DNS szakaszon elhelyezkedő gének nem létfontosságúak a baktérium számára, ezért azt rekombináns DNS technikák segítségével kicserélhetjük más génekre is, megteremtve ezzel a lehetőséget, hogy a növénybe egy idegen gént juttassunk be.

A kívánt génnel együtt antibiotikum rezisztencia gént is beépítenek, ezért a GM növények szelektálása antibiotikum tartalmú táptalajon történik. Kiszámú esetben spontán mutációval is létrejöhét rezisztencia, emiatt a rezisztencia megnyilvánulása önmagában nem elegendő, a transzgén jelenlétének a bizonyítására további molekuláris bizonyítások szükségesek. DNS, RNS és fehérje szinten igazolják a transzgén jelenlétét.

Kloroplaszt transzformáció

Kloroplaszt transzformálás során a bevitt DNS szakasz nem random helyre, hanem specifikus helyre, homológ rekombinációval épül be. Így nem jöhet létre nem várt fenotípus az esetleges hibás helyre való beépülés miatt. A kloroplaszt nagy mennyiségben tud fehérjét termelni. A gén nem jut be a pollenbe, ezért csekély a lehetőség arra, hogy növényről növényre nem kívánatosan terjedjen. Legegyszerűbb a kloroplaszt transzformálást génpuskával végezni (2. ábra).

2. ábra: Génpuska

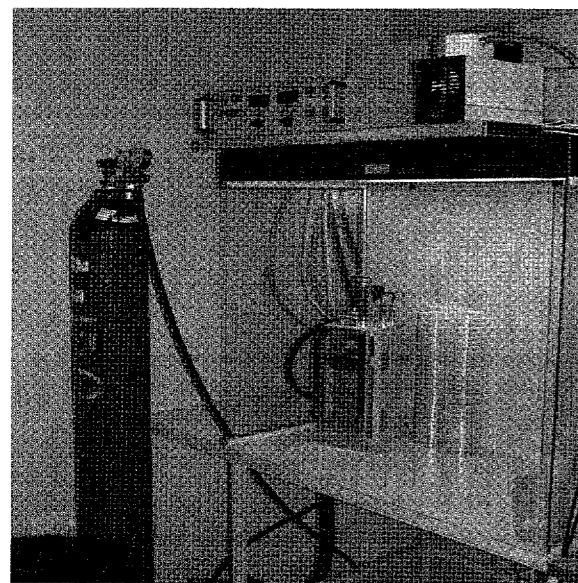


Figure 2: Genebooster

A transzformáló DNS-t Wolfram-részecskékhöz kötik, ezt felcseppentik a műanyag lövedékre, és vákuumban, nagy sebességgel csapódnak a részecskék a fiatal növényi sejtbe vagy növényi embrióba. A szövet a transzformálás során roncsolódik, ezért regeneráló táptalajra helyezik a leveleket. A transzformált egyedek kiválasztását szintén szelektációs antibiotikum tartalmú táptalajon végzik.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleteinket a Sambrook: *A Laboratory Manual* leírásai szerint végeztük (Sambrook et al., 1989). A munkánk során alapvető molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. Ezek között fontos megemlíteni a DNS, mRNS izolálást, a polimeráz láncreakciót, az agaróz gélelektroforézist, a DNS restrikciós emésztést, a ligálást, a kompetens *Escherichia coli* sejt transzformálást, a plazmid izolálást.

Munkánk során *Escherichia coli* DH5 α , *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 (Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey) baktérium törzseket és *Nicotiana tabacum* (Ottawa) dohány növény fajtát használtunk.

Az *Agrobacterium*-mal történő növénytranszformálás során vad típusú levélkorongokat a vektorkonstruktokat tartalmazó *Agrobacterium* szuszpenzióval kezeltük, majd regeneráció után a levélkorongokat áthelyeztük antibiotikum (kanamycin – Duchefa) tartalmú regeneráló táptalajra. A szelektiót követően regenerált, vélhetőleg transzformáns növényeket molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk (DNS, RNS kivonások – Fermentas kitek, PCR – Promega enzimek, klónozás pGEM-T Easy vektorba – Promega, szekvenálás – Biomi Kft).

A kloroplaszt transzformálás során a levélkorongokat meglőttük a volframhoz abszorbeált DNS részecskékhöz a Richter zRt. tulajdonát képező Genbooster (ELAK Bt.) segítségével (Maliga, 2004). Többszörös szelektiót (spectinomycin, streptomycin – Duchefa) követően a regenerálódott növényeket a fentebb említett módszerekkel vizsgáltuk, és bizonyítottuk a transzgén jelenlétét.

EREDMÉNYEK

Nukleáris transzformáció

A nukleáris transzformációhoz szükséges bináris vektor megtervezésekor pPZP100 vektorból indultunk ki (Hajdukiewicz et al., 1994).

A klónozó vektor a jobb (RB) és a bal oldali határ szekvenciák (LB) között két géneket tartalmazott. Az egyik kazetta felelős a kanamycin rezisztencia kialakításáért, a másik pedig a transzgént tartalmazta. Promóterként az S35 promótert, terminátorként pedig a Tnos (nopalín-szintetáz) terminációs szakaszt (Svab et al., 1990b; Velten et al., 1984) építettük be a szelektációs kazettába. Az S35 egy konstitutív, erős promóter, amelyet a karfiol mozaik vírusból (CaMV)

izoláltak. A PAF génje elé a P2' promótert építettük be, amely az octopine típusú Ti-plazmidból izolált konstitutív promóter. Itt is a kazetta a Tnos terminációs szekvenciával végződik (3. ábra).

3. ábra: A pPZP100 vektorból kiindult klónozó vektor részlete, ami tartalmazza a kanamycin szelektációs kazettát és a paf gént különböző formákban

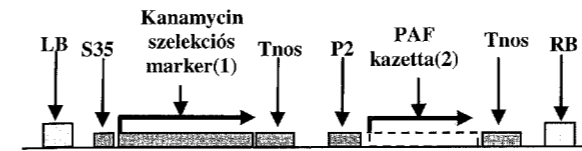


Figure 3: Cloning vector from pPZP100 vector containing the kanamycin selection cassette and different forms of the paf gene
Kanamycin selection marker(1), PAF cassette(2)

Különböző vektorkonstruktokat hoztunk létre, amit a paf kazettába építettünk be (4. ábra):

a. **Pre-Pro-mature-PAF:** A Pre-Pro-mature-PAF tartalmazza a teljes prekursor PAF proteint, mely a periplazmatikus térbe választódik ki.

b. **Pre-Pro-mature-PAF+ozmotin:** Ebben az esetben a gén 3' végéhez fuzionáltattunk egy vakuoláris lokalizációért felelős, az oszotin 18 ill. 20 aminosavból álló C terminális részét kódoló, rövid szekvenciát (Melchers et al., 1993; Neale et al., 1990).

c. **GE+Pre-Pro-mature-PAF:** A harmadik esetben a paf gént tartalmazó bináris vektorba a gén 5' végére a β -D-glukán exohidroláz szignálját kódoló szekvenciáját raktuk. Ez az N-terminálison található, és a sejten kívülre való szállításért felelős (Matsui et al., 2006).

d. **38P+Pre-Pro-mature-PAF:** A következő Pre-Pro-mature-PAF-ot tartalmazó vektorkonstrukta a 38 kDa peroxidáz szignálját kapcsoljuk, ami szintén a sejten kívülre való szállításban játszik szerepet, és az N-terminálison található (Matsui et al., 2006).

e. **mature-PAF:** Ez a vektorkonstrukta a pre-, proszekvencia nélküli mature PAF-ot tartalmazza.

f. **38P+mature-PAF:** Ez a konstrukta a pre-, proszekvencia nélküli mature PAF-ot tartalmazza, aminek az 5' végére a fentiekben leírt 38 kDa peroxidáz szignálját kapcsoljuk.

4. ábra: A PAF tartalmú transzformált kazetták szerkezete

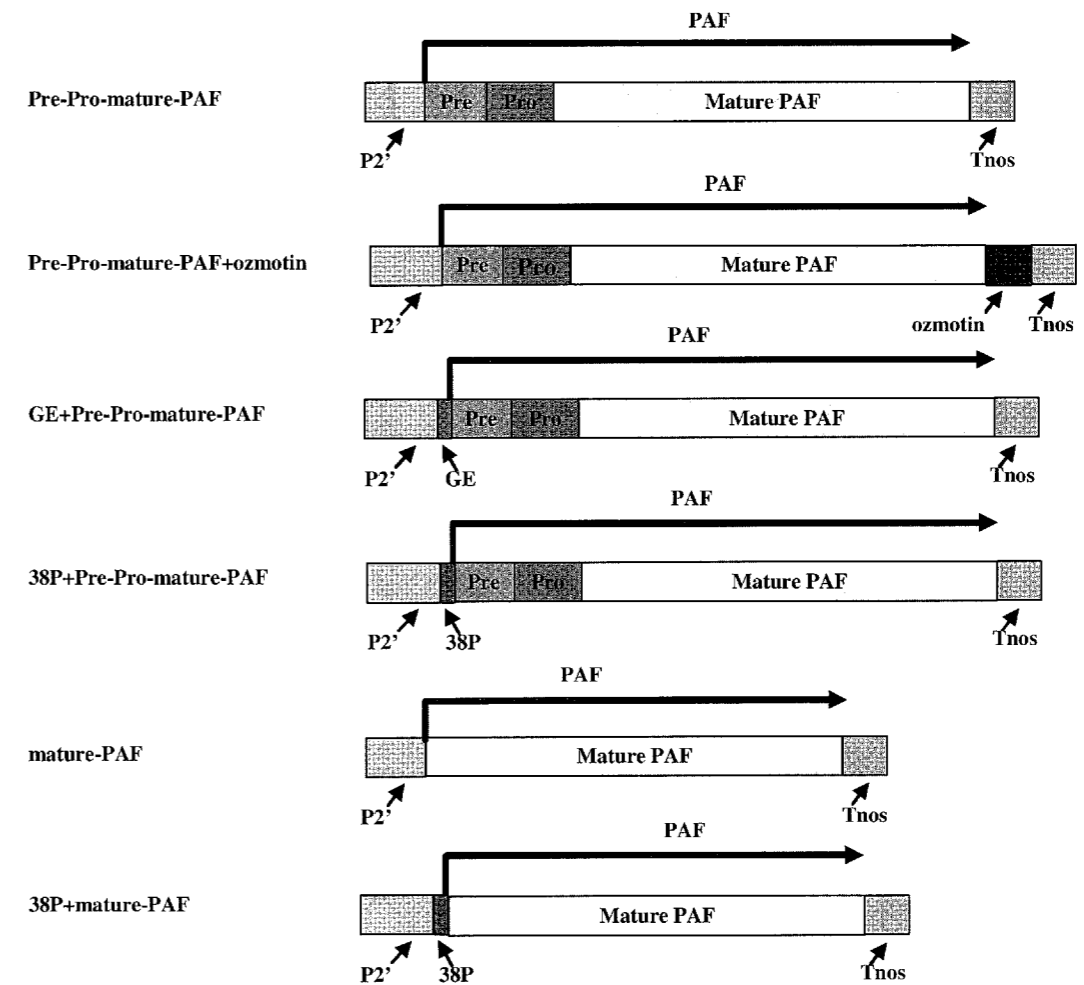
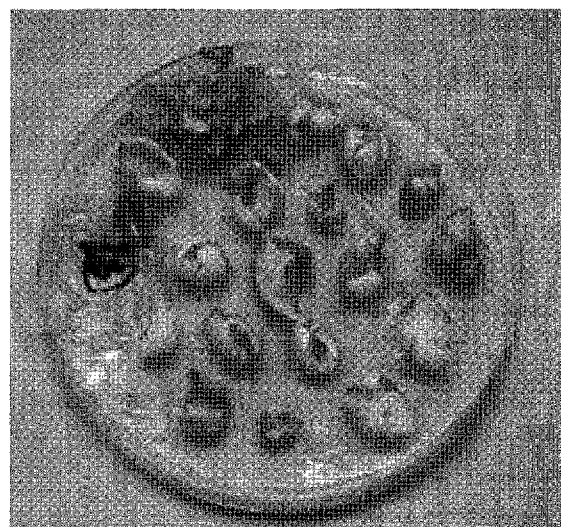


Figure 4: Structure of the transformation cassette with paf

A konstruktokat a pPZP *Agrobacterium tumefaciens* bináris vektorokba (Hajdukiewicz et al., 1994) egy P2 promótert és egy Tnos (nopalín szintetáz) terminátor régiót tartalmazó expressziós kazettába építettük be (Svab et al., 1990b; Velten et al., 1984). A hat különböző bináris vektort tartalmazó *Agrobacterium*-okkal dohány modellnövényeket transzformáltunk (Lutz et al., 2006), majd kanamycin rezisztencia markerrel szelektáltunk (5. ábra).

A feltételezett transzformánsokból DNS és RNS kivonást végeztünk. PCR technikával és szekvenálással bizonyítottuk a *paf* gén jelenlétét, illetve transzkripcióját a dohány növényben (6. ábra).

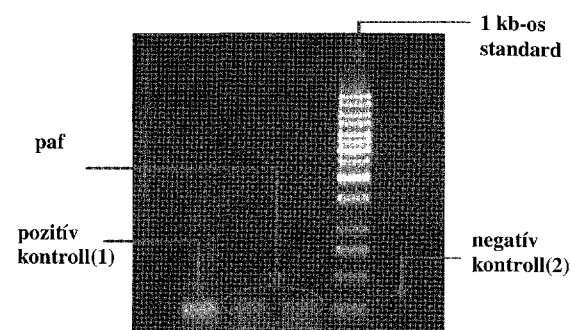
5. ábra: Kanamycin antibiotikum tartalmú táptalajon regenerálódott *paf* gént tartalmazó dohány növények



Az első képen a transzformálás után 4 hetes állapotban regenerálódott táptalajon láthatóak a növények, a második képen pedig már új táptalajon a transzformációt követő 8. héten láthatóak(1)

Figure 5: Regenerated tobacco plants contain *paf* gene on media with kanamycin antibiotic
The first picture shows the plants after the transformation 4 weeks, the second after the transformation 8 weeks(1)

6. ábra: Regenerálódott növényből kivont genomi DNS-ből készült PCR-termékek agaróz gélelektroforézis eredménye



Az gélelektroforézis során pozitív kontrollként egy *paf* gént tartalmazó vektorkonstruktot, negatív kontrollnak egy nem-transzformált, vad dohány növényt, standardként 1 kb-os DNS létrát használtunk. A gélképen 276 bp-nyi *paf* gén látható(3)

Figure 6: The result of the gelelectroforesis of the PCR product of DNA from the regenerated plants

Positive control(1), Negative control(2), We used a vector which contains the *paf* gene as positive control, a non-transformed plant as negative control, 1kb ladder as standard. The picture shows the 276 bp *paf* gene(3)

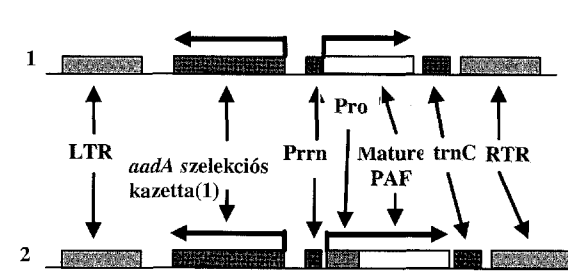
Kloroplaszt transzformáció

A GENOMNANOTECH Debrecen Regionális Egyetemi Tudásközpont (GND RET) keretében az Egyesült Államokban (Waksman Institute Rutgers University, Piscataway, NJ) Prof. Maliga Páltól megtanultuk a kloroplaszt transzformációs eljárást, amelyet Magyarországon még nem alkalmaznak.

A kloroplaszt transzformáció során két különböző vektorkonstruktot állítottunk elő. Abban különböznek egymástól, hogy az 1. konstrukt a PAF-mature, a 2. konstrukt a pro-PAF-mature szekvenciát tartalmazza (7. ábra). Szelektációs markerként a transzformáló vektorba az *aadA* gén van beépítve, amely streptomycin és spectinomycin rezisztenciáért felelős. A konstruktokban megtalálható még a PAF-mature, illetve Pro-PAF-mature szekvencia előtt egy konstitutív promóter (Prn), valamint mögött egy terminációs szekvencia (trnC). A Prn szerepe: rRNS promóter, amely konstitutívan termelődik. A trnC szerepe: plasztisz tRNS gén terminációs szekvenciája. Emellett a konstruktokban megtalálható az LTR (Left Target Region), és a RTR (Right Target Region) szakasz is. Ezek a szakaszok a kloroplaszt genomban ott találhatóak meg, ahová a *paf* gén homológ rekombinációval beépül. Az elkészített PAF szekvenciákat – mature-PAF (1.), Pro-mature-PAF (2.) – tartalmazó kloroplaszt transzformációs vektorokat bejuttattuk dohány növénybe génpuska (2. ábra) segítségével (Maliga, 2004; Svab et al., 1990a; Lutz et al., 2007).

A vektorkonstruktok transzformálása után a növényeket spectinomycin, majd spectinomycin és streptomycin antibiotikum tartalmú táptalajra helyeztük (9. ábra). A regenerálódott feltételezett transzformáns növényekből genomi DNS kivonása után PCR technikával bizonyítottuk a *paf* gén jelenlétét (8. ábra).

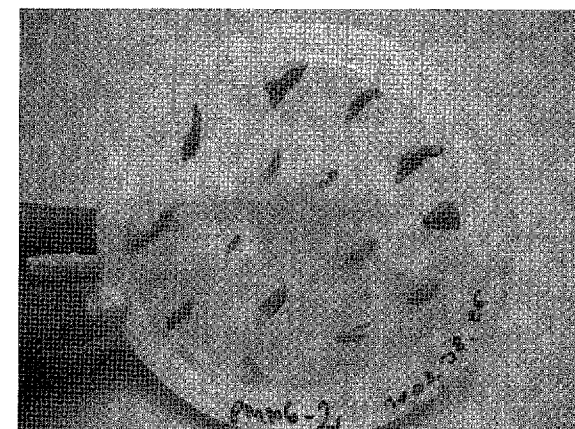
7. ábra: A *paf* gént tartalmazó kloroplaszt transzformációs vektor elkészítése, és szerkezete



Az első kloroplaszt transzformációs rendszer a PAF mature szekvenciáját tartalmazza, a második pedig a Pro-mature szekvenciát(2)

Figure 7: The structure of the *paf* plastid transformation vectors
aadA selection cassette(1), The first plastid transformation system contains the PAF mature sequence, the second contains the Pro-mature(2)

9. ábra: Spectinomycin antibiotikum tartalmú táptalajra helyezett transzformált levélkorongok



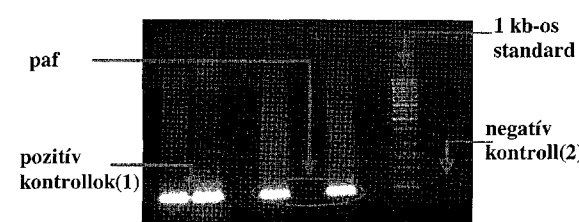
A második képen egy feltételezett transzformáns növény látható(1)

Figure 9: Transformed leaf disk on media with spectinomycin
The second picture shows a hypothetical transformed plant(1)

DISZKUSSZIÓ

Munkacsoportunk elsődleges célként tűzte ki, hogy a Debreceni Egyetemen elsőként adaptálja a nukleáris és a kloroplaszt transzformációs technikákat. Több vektorkonstruktot terveztünk, melyek különböző formában tartalmazták a PAF gént. Ezeket kloroplaszt és nukleáris transzformációs technikákkal transzformáltuk a

8. ábra: A feltételezeten transzformált növényekből kivont genomi DNS-ekből készült PCR-termékek agaróz gélelektroforézis eredménye



A gélelektroforézis során pozitív kontrollként *paf* gént tartalmazó vektorkonstruktokat, negatív kontrollnak egy nem transzformált, vad dohány növényt, standardként 1 kb-os DNS létrát használtunk. A gélképen 276 bp-nyi *paf* gén látható(3)

Figure 8: The result of the gelelectroforesis of the PCR product of DNA from the plastid transformed regenerated plants
Positive controls(1), Negative control(2), We used vectors which contain the *paf* gene as positive controls, a non-transformed plant as negative control, 1kb ladder as standard. The picture shows the 276 bp *paf* gene(3)



dohány növénybe. Az antibiotikus szelektáció során sikerült valószínűsíthető *paf* transzformáns növényeket regeneráltatnunk. Majd DNS és RNS szinten bizonyítottuk a transzgén jelenlétét.

Megállapíthatjuk, hogy tanszékünkön sikeres transzformációs eljárásokat adaptáltunk, mely eszközökkel különféle vakcinák, és gyógyászatban használt anyagok növényben való termelése válik lehetővé.

IRODALOM

Hajdukiewicz, P.-Svab, Z.-Maliga, P. (1994): The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, 25. 6. 989-94.
Kaiserer, L.-Oberparleiter, C.-Weiler-Görz, R.-Burgstaller, W.-Leiter, E.-Marx, F. (2003): Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch. Microbiol.*, 180. 3. 204-10.
Lutz, K. A.-Svab, Z.-Maliga, P. (2006): Construction of marker-free transplastomic tobacco using the Cre-loxP site-specific recombination system. *Nat. Protoc.*, 1. 2. 900-10.
Lutz, K. A.-Azhagiri, A. K.-Tungsuchat-Huang, T.-Maliga, P. (2007): A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Physiol.*, 145. 4. 1201-10.

- Maliga, P. (2004): Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55. 289-313.
- Marx, F.-Haas, H.-Reindl, M.-Stöffler, G.-Lottspeich, F.-Reidl, B. (1995): Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene.*, 167. 167-171.
- Marx, F.-Salvenmoser, W.-Kaiserer, L.-Graessle, S.-Weiler-Görz, R.-Zadra, I.-Oberparleiter, C. (2005): Proper folding of the antifungal protein PAF is required for optimal activity. *Res. Microbiol.*, 156. 1. 35-46.
- 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.
- Matthysse, A. G.-Stump, A. J. (1976): The presence of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid DNA in crown gall tumour cells. *J. Gen. Microbiol.*, 95. 1. 9-16.
- Melchers, L. S.-Sela-Burlage, M. B.-Vloemans, S. A.-Woloshuk, C. P.-van Roekel, J. S.-Pen, J.-van den Elzen, P. J.-Comelissen, B. J. (1993): Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and beta-1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 21. 4. 583-593.
- Neale, A. D.-Wahleithner, J. A.-Lund, M.-Bonnett, H. T.-Kelly, A.-Meeks-Wagner, D. R.-Peacock, W. J.-Dennis, E. S. (1990): Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell.*, 2. 7. 673-684.
- Oberparleiter, C.-Kaiser, L.-Haas, H.-Ladurner, P.-Andratsch, M.-Marx, F. (2003): Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive *Aspergilli*. *Antimicrob. Agents and Chemoter.*, 47. 3598-3601.
- Sambrook, J.-Fritsch, E. F.-Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory
- Svab, Z.-Hajdukiewicz, P.-Maliga, P. (1990a): Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 87. 21. 8526-8530.
- Svab, Z.-Harper, E. C.-Jones, J. D.-Maliga, P. (1990b): Aminoglycoside-3'-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant. Mol. Biol.*, 14. 197-205.
- Velten, J.-Velten, L.-Hain, R.-Schell, J. (1984): Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.*, 3. 2723-2730.