

Τύπος άρθρου : γράμματα

Χωρίς νικοτίνη, μη διαγονιδιακό καπνό (*Nicotianatabacum*L.) Επεξεργασία από την Cas9

Συγγραφείς

Τζούλια Σαχτσίκ¹, Φήλιξ στέικ¹

Συνεργασίες

¹εργαστήριο τεχνικής Βιοχημείας, τμήμα βιοχημικής και Χημειομηχανολογίας, Πανεπιστήμιο του Ντόρτμουντ, Εμίλ-Φίγκε-Str. 66, 44227 Ντόρτμουντ, Γερμανία

Αλληλογραφία

Φίλιξ στέικ

Εργαστήριο τεχνικής Βιοχημείας, τμήμα βιοχημικής και χημικής μηχανικής, το Πανεπιστήμιο του TU Dortmund, Εμίλ-Φίγκε-Str. 66, 44227 Ντόρτμουντ, Γερμανία. Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο: felix.stehle@tu-dortmund.de τηλέφωνο: + 49 231 7555115

Λέξεις-κλειδιά: Ευκριπ-Cas9, νικοτίνη-FR, επεξεργασία γονιδίων, μη μεταλλαγμένα, *Nicotianatabacum*

Αυτό το άρθρο έχει γίνει αποδεκτό για δημοσίευση και έχει υποβληθεί σε πλήρη αξιολόγηση από ομοτίμους, αλλά δεν έχει γίνει μέσω της διαδικασίας εγγραφής, ρύθμισης, σελιδοποίηση και διόρθωσης, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές μεταξύ αυτής της έκδοσης και της έκδοσης της καρτέλας. Παρακαλώ αναφέρετε αυτό το άρθρο ως Ντόι:

10.1111/PBI.13193

Αυτό το άρθρο προστατεύεται από πνευματικά δικαιώματα. Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται.

Σε όλο τον κόσμο περίπου 1.100.000.000 άνθρωποι είναι καπνιστές και περισσότεροι από 7.000.000 άνθρωποι πεθαίνουν από τις αρνητικές επιπτώσεις του smokingevery χρόνο (που αναφέρουν, 2017). Ένα από τα κύρια φυσικά συστατικά που κάνουν την εξάρτηση από τον καπνό είναι η νικοτίνη. Ο καπνός με μειωμένο περιεχόμενο νικοτίνης μπορεί να βοηθήσει τους ανθρώπους να ξεπεράσουν τον εθισμό τους στη νικοτίνη. Τα τσιγάρα χωρίς νικοτίνη (ή μειωμένη νικοτίνη) μπορεί να συμβάλουν στη μείωση του αριθμού της κατανάλωσης νικοτίνης, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο θανάτου από τη χρήση καπνού. Τα περισσότερα γονίδια που συνδέονται με τη βιοσύνθεση νικοτίνης στον καπνό είναι γνωστά και καλά χαρακτηρισμένο (Ντιούι και Ξι, 2013). Αυτό ανοίγει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν προσεγγίσεις γενετικής μηχανικής για να αλλάξει το αλκαλοειδές περιεχόμενο του φυτού, και, ειδικότερα, να μειώσει τη μονάδα νικοτίνης. Η ίδια η νικοτίνη αποτελείται από μια πυρρολιδίνη και ένα δακτύλιο πυριδίνης, τα οποία συντίθενται σε ανεξάρτητες οδούς (σχήμα 1 α). Πρόσφατες προσεγγίσεις αντιμετωπίζονται με τον σιγαστήρα των άνω γονιδίων της οδού που κωδικοποιούν την πατρερωκίνη *N*-μεθυλοτρανσφεράση (ΕΚΠ) ή A622, ένα ΦΩΣΦΑΤΙΔΥΛΙΝΟΣΙΤΟΛ-4-φωσφορικό (PIP)-μέλος της οικογένειας του NADPH-αναριτάσης. Οι εφαρμοσμένες μέθοδοι σιγαστήρα RNA είχαν ως αποτέλεσμα είτε την αυξημένη βιοσύνθεση άλλων αλκαλοειδών όπως η ανατουβίνη (δηλ. Wang et al., 2009) ή ήταν επιτυχής μόνο σε τριχωτό λατρεία και από-2 κύτταρα, αλλά όχι σε ολόκληρα φυτά (Kajikawa et al., 2009). Το τελικό βήμα οξείδωσης στη βιοσύνθεση της νικοτίνης, καθώς και της αναβίνης και της αναμπασίνης, προτείνεται να καταλύσει από φλαμοπρωτεΐνες της οικογένειας των ενζύμων της γέφυρας Berberine (BBL) (κατζικάβα et al., 2011). Η νοκ άουτ από τα τρία πιο ιδιαίτερα εκφρασμένα *BBL*-γονίδια (*bbla*-*bblc*) από το RNAi ή το νοκ-ντάουν με μεταλλάξεις που προκαλούνται από EMS είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της περιεκτικότητας σε νικοτίνη χωρίς αυξάνοντας το περιεχόμε άλλων αλκαλοειδών (Κατζικάβα et al., 2011, Λούις ET Al., 2015). Πρόσφατα, η οικογένεια *BBL*-Gene στον καπνό επεκτάθηκε με την ταυτοποίηση των *BBL*. 2 και πλ., οδηγώντας σε έξι γνωστές ισομορφές (κατζικάβα ET Al., 2017). Έτσι, η simultaneousknockout αυτών των *BBL*-γονιδίων είναι μια υποσχόμενη προσέγγιση για την παραγωγή ενός φυτού καπνού χωρίς νικοτίνη.

Στόχος μας ήταν μια απλή στρατηγική νοκ-άουτ με βάση το Cas9 και αναζητήθηκε μια πανομοιότυπη ακολουθία στόχου που υπάρχει και στις έξι δημοσιευμένες ακολουθίες κωδικοποίησης (*bbla*, *bblc*, *bbl*. 2 προήλθε από Νικονατιασλοβάρις · *Bblb*, *bbl*.1, πλ. Κατζικάβα et al., 2011; 2017) για να καταστεί δυνατή η χρήση ενός Εκτός από την ακολουθία PAM, η επιλεγμένη ακολουθία στόχου είναι πανομοιότυπη και στις έξι ακολουθίες *BBL* (σχήμα 1 β). Οι αντιστοιχίες με άλλες ακολουθίες του abacum γονιδιώματος *N. t* αποκλείστηκαν από την έρευνα έκρηξης. Κλωνοποιήσαμε την ακολουθία του στόχου των 20 βασικών ζευγίων μεταξύ του 6-26 της Ουμπεβάνα από το *Arabidopsis thaliana* και την Τσιμερία σγκράνα. Η κασέτα γονιδίων μεταφέρθηκε στη συνέχεια στο φορέας μετασχηματισμού pCas9-TPCcarrying ένα *μαρ*-γονίδιο ως δείκτη επιλογής (Fauser et al., 2014).

Μετά τη μεταμόρφωση στο *Nicotianatabacum* L. φυτά "Βιρτζίνια καπνός καπνίσματος" (αυστηρά φαρμακευτικά σπόροι ΔΕΠΕ, Ηνωμένες Πολιτείες), αναγεννημένες δέκα φυτά, που τους συμβολίζεται ως T₀ και ανέλυσε την περιεκτικότητα σε νικοτίνη. Εκχύλιση των αλκαλοειδή έγινε από γειωμένα φύλλα και νικοτίνης levels were analyzed με GC-ΣΧΣ. Η μεταβολή των επιπέδων νικοτίνης κυμαινόταν από αμετάβλητη (t₀ 5) σε μεσαία μείωση 65% (t₀

3) σε μείωση περίπου 95% (T₀ 1 και t₀ 4) σε σύγκριση με τον άγριο τύπο, υποδεικνύοντας ότι δεν είχαν πέσει όλα τα *BBL* loci. Η αλληλουχία των τμημάτων του γονιδιώματος DNA από τα φυτά T₀ 1 και t₀ 4 δεν έδειξε επεξεργασία των *πλ*, ενώ όλες οι άλλες *BBL*-genes were μεταλλαχθεί. Το T₀ τα φυτά 1, 3 και 4 επιλέχθηκαν για περαιτέρω χαρακτηρισμοί στις επόμενες γενιές. Οι ρίζες καλλιεργούνται σε ένα θάλαμο φυτών για την αυτοεπικονίαση, προκειμένου να παραχθούν σπόροι T₁. Για να καταστεί δυνατή η περαιτέρω επεξεργασία γονιδίων με το Cas9, επιλέγουμε διαγονιδιακή T₁ φυμοφοσφορικήτητα (PPT). Διαγονιδιακές T₁ φυτά καλλιεργούνται έως ότου Ανθοπωλεία και T₂ φυτά καλλιεργούνται από συλλέγονται σπόροι. Αυτός ο αυξανόμενος κύκλος συνεχίστηκε για τη λήψη φυτών t₃. Ενώ η περιεκτικότητα σε νικοτίνη στο φυτό T₁ 1,2 δεν μειώθηκε περαιτέρω, παρατηρήθηκε μείωση της περιεκτικότητας σε νικοτίνη κατά 95% για τη μονάδα t₁ 3,1. Το επίπεδο νικοτίνης του φυτού T₁ 4,11 ήταν τόσο χαμηλό όσο σε γενιά 0.

Για να ταυτίσουν τα φυτά καπνού χωρίς νικοτίνη που μεταφέρουν νικ άουτ και στα 6 γονίδια *BBL*, τα προγόνια των φυτών t₀4 έως γενιά t₃ ήταν ψηφιακά με την περιεκτικότητα σε νικοτίνη.

Η ανάλυση GC της περιεκτικότητας σε νικοτίνη των εγκαταστάσεων που αναλύθηκαν t₂ και t₃ οδήγησε σε ελάχιστες κορυφές με χρόνο κατακράτησης στο πρότυπο νικοτίνης. Για να εξασφαλιστεί η σωστή ταυτοποίηση της κορυφής ως νικοτίνης, εκτελέστηκε μια μέτρηση GC-MS. Ένα m/z 162,23 πανομοιότυπο με τη νικοτίνη είχε γίνει με μια αναλογία σήματος προς θόρυβο σχεδόν 1:1. Δεδομένου ότι ο λόγος σήματος-προς-θόρυβου των κορυφών ήταν πολύ χαμηλός για αυτοματοποιημένη μέγιστη ανίχνευση, η ανάλυση της αιχμής της περιοχής διάτρησης έγινε για την εκτίμηση της περιεκτικότητας σε νικοτίνη. Υπολογίστηκε σε 0,06 mg g DW⁻¹ νικοτίνης στο t₂ 4.11.1 και σε 0.04 mg g DW⁻¹ νικοτίνης στο εργοστάσιο t₃ 4.11.1.2 (σχήμα 1 γ), που σημαίνει μείωση κατά 99,6% d 99,7%, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τον άγριο τύπο. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, το φυτό T₃ 4.11.1.2 θεωρήθηκε χωρίς νικοτίνη.

Τέλος, για να ελέγξουμε αν και τα 12 loci είχαν πέσει νοκ άουτ από την προσέγγισή μας, εφαρμόστηκε μια μέθοδος βασισμένη σε PCR. Ο συνδυασμός μιας στρατηγικής κλωνοποίησης βασισμένη σε διάνυσμα για τα ενισχυτά, ακολουθούμενη από την αλληλουχία Σάνγκερ με την άμεση αλληλουχία του προϊόντος PCR, καθιστάπεριττή τη γονιδιακή βάση. Η προϋπόθεση για την προσέγγιση αυτή ήταν η εισαγωγή ενός μοναδικού νουκλεοτιδικού τριών βασικών ζευγών πάνω από την ακολουθία PAM με αποτέλεσμα μια μετατόπιση, δηλαδή ένα νοκ-άουτ. Αντίθετα, το *Arabidopsis* και το ρύζι, οι εισαγωγές ή η διαγραφήπολλών βασικών ζευγών παρατηρήθηκαν μετά από εκδηλώσεις μη ομόλογες end (njej) (Jiang et al., 2013). Ωστόσο, για το *bbla*, τα αποτελέσματα της αλληλουχίας έδειξαν είτε την εισαγωγή της βάσης γουανίνης είτε της θυμίνης, ενώ η ακολουθία των αποτελεσμάτων των άλλων *BBL* γονιδίων σύρσιμοέδειξε την ίδια εισαγωγή ζεύγους βάσης (σχήμα 1 δ). Για να επιβεβαιωθούν αυτά τα αποτελέσματα, τα τμήματα των γονιδίων της *BBL* ενισχύθηκαν και αλληλεγέντλονται άμεσα. Τα προηγούμενα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ανάλυση του ίχνους της αλληλουχίας των δειγμάτων (σχήμα 1E). Εκτός από το *bbla*, το ίχνος αλληλουχίας των θραυσμάτων έδειξε μια ξεχωριστή αιχμή του σήματος για την κατάλληλη εισαγωγή βάσης. Για το *bbla* η αλληλουχία έδειξε μια διπλή κορυφή για τη θυμιδιά και την γουανίνη, η οποία συνάδει με τα αποτελέσματα από τα πειράματα κλωνοποίησης, στα οποία εντοπίστηκαν και οι δύο εισαγωγές ζεύγους βάσεων.

Για να αποδειχθεί ότι το φυτό χωρίς νικοτίνη είναι μη διαγονιδιακό, οι δίσκοι φύλλων είχαν κοπεί και μεταφερθεί, μετά την αποστείρωση της επιφάνειας, σε MS-μεσαίο με PPT για επιλογή. Ως έλεγχος, ένα διαγονιδιακό εργοστάσιο γενιάς T1 που χρησιμοποιείται. Μετά από δύο εβδομάδες, οι δίσκοι φύλλων του φυτού T1 ήταν ακόμα Πράσινοι και ακόμη και άρχισαν να αναπτύσσονται, ενώ οι δίσκοι φύλλων του φυτού χωρίς νικοτίνη πέθανε. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε επιπλέον με PCR με τη χρήση primers που δεσμεύουν μέσα στην κασέτα μετασχηματισμού που εκτείνεται από τον εξολοθρευτή του Cas9 και το γονίδιο PPT (σχήμα 1F). Ως θετικός έλεγχος, χρησιμοποιήθηκε γονιδιωμικό DNA από ένα εργοστάσιο T0. Δεν υπάρχει ούτε για τον άγριο τύπο ούτε για τη δοκιμαζόμενο φυτό χωρίς νικοτίνη ένα προϊόν PCR. Έτσι, το φυτό χωρίς νικοτίνη δηλώθηκε ως μη-μεταλλαγμένη.

Ανάλυση των μετρήσεων GC έδειξε, ότι τα αλκαλοειδή αναραβίνη, νορνικοτίνης aND anabasinewerepriegi εκχύλισμα μπαλαντέρ, αλλά το τελευταίο δύο το όριο ανίχνευσης. Το χρωματογράφημα του φυτού χωρίς νικοτίνη έδειξε ξανά ίχνη της αναμπασινανονικοτίνης, καθώς και μειωμένη έκταση αιχμής για την ανατβίνης. Επιπλέον, ¹H-NMR μετρήσεις επαλήθευσαν ότι δεν υπήρχαν ουσιαστικές μεταβολές του πρωτογενούς μεταβολισμού, που να δείχνουν ότι η πλήρης νοκ-άουτ της οικογένειας *BBL*-Gene δεν είχε αρνητικό αντίκτυπο σε άλλες βιοσυνθετικές των δοκιμασμένες συνθήκες ανάπτυξης. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στον φαινότυπο (σχήμα 1 ζ).

Συμπέρασμα

Η γενιά ενός φυτού χωρίς νικοτίνη και μη διαγονιδιακό καπνού επιτρέπει την εισαγωγή αυτού του φυτού σε άλλες ποικιλίες καπνού και τη μείωση της συνολικής περιεκτικότητας νικοτίνης και αλκαλοειδή. Επιπλέον, η χρήση ενός ενιαίου gRNA για το πλήρες σύνολο των γονιδίων που σχετίζονται με τη *BBL* καθιστά εύκολη την εφαρμογή της μεθόδου αυτής σε άλλες ποικιλίες και είδη καπνού, π.χ. χρησιμοποιούνται ως πλατφόρμες παραγωγής ετερόλογο. Αυτό θα επεκτείνει το φάσμα παραγωγής του *N. benthamiana* στη βιολογική παραγωγή φυτικών προϊόντων που έχουν αναπτυχθεί πέρα από τα αντισώματα.

Επιβεβαίωση

Είμαστε ιδιαίτερα ευγνώμονες στον Oliver Kayser για μεγάλη ενθάρρυνση, καρποφόρες συζητήσεις και οικονομική στήριξη. Ευχαριστούμε τον Holger Puchta (Πανεπιστήμιο της Καρλσρούη, Γερμανία) για την παροχή υψηλής ποιότητας Cas9 πλασμικίδων και Heribert Warzecha (Πανεπιστήμιο του Darmstadt, Γερμανία) για την παροχή του στελέχους. Ευχαριστούμε τον Γκαμπριέλ Χάρντες και τον Μάικλ Κουμπίμπι (INFU. Το Πανεπιστήμιο του Ντόρτμουντ, Γερμανία) για βοήθεια με μετρήσεις GC-MS. Είμαστε επίσης ευγνώμονες στην Chantale Zammarelli για την άριστη τεχνική βοήθεια με την προετοιμασία δειγμάτων NMR και τις μετρήσεις GC, καθώς και την Angela Sester που βοήθησε στην ανάλυση NMR-Data και την Πάτι Κράμπι και τον Γιαν Βόλμερ για τη βοήθειά τους με Οι συγγραφείς ευχαριστούν την Μαγκνταλένα Θωμά και τον Φάμπιο Αλβαράντο για τη βοήθειά τους in revisiNG το αγγλικό κείμενο.

Δήλωση συνεισφορών συντάκτη

Η F.S. συνέλαβε τη μελέτη. Οι F. S και J. S σχεδίασαν τα πειράματα και έγραψαν το χειρόγραφο. Γ.Σ.

έκανε τα πειράματα. Όλοι οι συγγραφείς διαβάζουν και εγκρίνουν το τελικό χειρόγραφο.

Σύγκρουση συμφερόντων

Οι συγγραφείς δεν δηλώνουν ανταγωνιστικά οικονομικά συμφέροντα.

Αυτό το άρθρο προστατεύεται από πνευματικά δικαιώματα. Όλα τα δικαιώματα διατηρούνται.

Αναφορές:

Ντιούι, R.E. και Ξι, J. (2013) μοριακή γενετική της αλκαλοειδούς βιοσύνθεσης στο νικοντιανή *tabacum*. *Φυτοχημεία*, **94**, 10 – 27.

Φωσέρ, F., Schiml, S. και Puchta, H. (2014) τόσο οι Νουκλεάσες και οι ΝΙΚΟΛΙΤΕς που βασίζονται σε πιο ευκρινή CAS μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποδοτικά για τη μηχανική του γονιδιώματος στο *Arabidopsis thaliana*. *Φυτό J.*, **79**, 348 – 359.

Κατζικάβα, μ., Χιράι, ν. και Χασιμότο, τ. (2009) μια ΠΡΩΤΕΪΝΗ rip-Family είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των αλκαλοειδών καπνού. *Φυτό MOL. Biol.*, **69**, 287 – 298.

Κατζικάβα, μ., Σότζι, τ., Κέιτο, α. και Χασιμότο, τ. (2011) Κεντόλε-μεταφρασμένες πρωτεΐνες του ενζύμου berberine της γέφυρας, απαιτούνται για ένα αργά βήμα της βιοσύνθεσης νικοτίνης στον καπνό. *Φυτό φυσικοσωματική.*, **155**, 2010 – 2022.

Κατζικάβα, μ., Σιέρο, ν., Καβκούτσι, χ., Μπακάγκι, ν., Ιβάνοφ, ν. β., Χασιμότο, τ. και Σότζι, Τ. (2017) Γονιδιωτική πληροφορίες για την εξέλιξη του μονοπατιού βιοσύνθεσης νικοτίνης στον καπνό. *Φυτό φυσικοσωματική.*, **174**, 999 – 1011.

Lewis, R.S., Λόπεζ, παίξει, Μπούουεν, S.W., Αντρές, K.R., Steede, W.T. και Ντιούι, R.E. (2015) διαγονιδιακή και μεταλλαγμένη-BA, καταστολή της οικογένειας γονιδίων της γέφυρας berberine-όπως (BBL) μειώνει το αλκαλοειδές περιεχόμενο του καπνού που καλλιεργείται σε χωράφι. *PLoS One*, **10**, e0117273.

Wang, P., Zeng, J., Λιανγκ, ζ., Μιάο, ζ., σαν, χ. και Τανγκ, κ. (2009) η σίγαση της έκφρασης εκδ προκάλεσε έξαρση της συσσώρευσης της αναβίνης στον καπνό. *Μολ. Βιολ.*, **36**, 2285 – 2289.

ΠΟΥ υποβάλλει έκθεση σχετικά με την παγκόσμια επιδημία καπνού 2017: παρακολούθηση της χρήσης και πρόληψης του καπνού

των πολιτικών. Γενεύη: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας · 2017 άδεια: CC BY-NC-SA 3,0 Έγκο

Υπομνήματα εικόνα:

Εικόνα 1 Nicotine νικοτίνη, μη διαγονιδιακό *Nicotianatabacum* L. επεξεργασία από την πιο ευκρινή-Cas9 (α) αλκαλοειδές βιοσύνθεσης Οδός: αλκαλοειδές βιοσύνθεση αποτελείται από δύο ανεξάρτητες οδούς, η πυρρολιδίνη και μια πυριδίνη Μονοπάτι. Τα ένζυμα της οικογένειας BBL-Gene προτείνονται να συμμετέχουν στο τελικό βήμα οξείδωσης για το σχηματισμό αλκαλοειδών καπνού. β) ευθυγράμμιση όλων των μελών της οικογένειας της BBL Gene:

οι έξι ακολουθίες γονιδίων της οικογένειας του *BBL* Gene ήταν ευθυγραμμισμένες και πιθανοί γονιδιακές στόχοι αξιολογήθηκαν με αποτέλεσμα μια ενιαία ακολουθία στόχου πανομοιότυπη και στα έξι γονίδια. γ) σύγκριση της περιεκτικότητας σε νικοτίνη του φυτού 4 σε όλες τις γενιές: η ποσότητα της νικοτίνης ποσοτικοποιήθηκε με GC-FC από 200 mg αποξηραμένου και γειωμένο υλικού φύλλων φυτών που εκχυλίζονται με MTBE. Η περιεκτικότητα σε νικοτίνη υπολογίστηκε ως mg ανά γραμμάριο ξηρού βάρους (DW). δ) το Γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από τη μονάδα T₃ 4.11.1.2 και μια μονάδα άγριων τύπων για την ενίσχυση των θραυσμάτων των έξι *BBL* γονιδίων· τα θραύσματα κλωνοποιήθηκαν σε ένα διάνυσμα για ευκολότερη αλληλουχία. Η εισαγωγή ενός ζεύγους βάσεων παρατηρήθηκε και στα έξι γονίδια. για *bbl*a δύο διαφορετικές εισαγωγές ζεύγος βάσης θα μπορούσε να είναι αλληλουχία των θραυσμάτων του γονιδιωματικού DNA των φυτών T₃ 4.11.1.2 χωρίς κλωνοποίηση σε διάνυσμα για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από την αλληλουχία των διανυσματος (f) Ενίσχυση του T-DNA cassette να δοκιμάσει αν το φυτό T₃ 4.11.1.2 (t₃) είναι ακόμα μεταλλαγμένη. Ως το στοιχείο του ελέγχου (PC) χρησιμοποιήθηκε ένα εργοστάσιο T₀, ως αρνητικός έλεγχος του άγριων τύπου (ε). ζ) Φαινότυπος φυτού άγριας μορφής και του φυτού χωρίς νικοτίνη (T₃ 4.11.1.2).

