



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

215 164 B

(21) A bejelentés ügyszám: 4086/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 03. 25.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/498,561 1990. 03. 23. US
07/586,765 1990. 09. 21. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/NL 91/00047
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/14782

(51) Int. Cl.⁶

C 12 N 15/55
C 12 N 9/16
A 23 K 1/165
C 12 N 15/82

(40) A közzététel napja: 1992. 10. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1998. 10. 28.

(72) Feltalálók:

Hoekema, Andreas, Oegstgeest (NL)
Pen, Jan, Leiden (NL)
Rietveld, Krijn, Vlaardingen (NL)
Sijmons, Peter Christian, Amsterdam (NL)
Verwoerd, Teunis Cornelis, Leiden (NL)
van Ooyen, Albert J. J., Voorburg (NL)

(73) Szabadalmazók:

Gist-Brocades N. V., Delft (NL)
Mogen International N. V., Leiden (NL)

(74) Képviselő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) **Eljárás fitáz kifejezésére transzgenikus növényekben, valamint eljárás
ilyen növények előállítására és felhasználására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás fitáz kifejezésére transzgenikus növényekben vagy növényi szövetekben, valamint eljárás ilyen növények előállítására. Növényeket olyan DNS expressziós konstrukciókkal transzformálnak, amely konstrukciók egy mikrobiális eredetű fitázt kódoló gént tartalmaznak olyan szabályozó szekvenciák mögé építve, amelyek képesek a fitáz ki-

fejeződését vezérelni konstitutíven és/vagy szövetspecifikusan.

A találmány szerint előállított transzgenikus növények vagy növényi szövetek különböző ipari folyamatokban alkalmazhatók, akár közvetlenül, például állati tápokban, akár közvetve, az expresszált fitázt extrahálva és szükség esetén felhasználás előtt tisztítva.

A találmány tárgya eljárás fitáz előállítására transzgenikus növényekben, eljárás ilyen növények előállítására, valamint az így előállított fitáz felhasználására ipari folyamatokban.

A foszfor minden szervezet növekedéséhez nélkülözhetetlen elem. Az állatállomány tartása során a tápot ki kell egészíteni szerves foszforral, hogy jó növekedési teljesítményt kapjunk az egygyomrú állatoknál (például sertések, csirkék, halak).

Ezzel ellentétben nincs szükség szerves foszfát hozzáadására a kérődző állatok tápjaihoz. A bendőben jelenlevő mikroorganizmusok olyan enzimeket termelnek, amelyek katalizálják a fitát (mio-inozit-hexakiszfószfát) inozittá és szerves foszfáttá alakulását.

A fitát tartalék-foszforforrásként jelentkezik majdnem az összes, növényből származó tápban [a téma részletes összefoglalása: Phytic acid, chemistry and applications, E. Graf (ed.), Pilatus Press; Minneapolis, MN, USA, (1986)]. Az összes dió, lisztes magvak, gumók, olajos magvak, spórák és pollenek 1–3%-a fitát. A fitinsav komplex sóit fitinnek nevezik. A fitinsavat káros tápkomponensnek tartják, mivel kelátot képez az ásványi anyagokkal, például a kalciummal, magnéziummal, cinkkel, vassal, és képes a fehérjékkel is reagálni, ezzel csökkentve a fehérjék és a táplálkozási szempontjából fontos ásványi anyagok biológiai hozzáférhetőségét.

A fitát foszfor keresztülhalad az egyszerű gyomrú állatok emésztőrendszerén, és a trágyába kiválasztódik. Jóllehet a fitát bizonyos mértékben hidrolizál a gyomorban, az így felszabadult szerves foszfátnak nincsen tápértéke, mivel a szerves foszfát csak a vékonybélben szívódik fel. Ennek az a következménye, hogy a tápérték szempontjából fontos foszfát jelentős mennyiségét nem hasznosítják az egyszerű gyomrú állatok, annak ellenére, hogy megtalálható a tápban.

A fitát foszfor trágyába való ürítésének további következményei is vannak. Az intenzív állattartás hatalmas mértékben megnövekedett az elmúlt évtizedben. Ennek az a következménye, hogy a keletkező trágya mennyisége is megnőtt, és a világ különböző részein környezeti problémákat okozott. A trágyából származó foszfát akkumulálódása a felszíni vizekben okozza részben az eutrofizációt.

A mikroorganizmusok által termelt enzimek, amelyek a fitát inozitra és szerves foszfátra való átalakulását okozzák, széles körben fitáz néven ismertek. A fitáztermelő mikroorganizmusok közé tartoznak a baktériumok, például a *Bacillus subtilis* [V. K. Paver and V. J. Jagannathan, *J. Bacteriol.*, 151, 1102 (1982)], és a *Pseudomonas* [D. J. Cosgrove, *Austral J. Biol. Sci.*, 23, 1207 (1970)]; élesztők, például a *Saccharomyces cerevisiae* [N. R. Nayini and P. Markakis, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 17, 24 (1984)]; valamint a gombák, például az *Aspergillus terreus* [K. Yamada, Y. Minoda and S. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, 32, 1275 (1986)]. Különböző más *Aspergillus* fajokról ismert, hogy fitázt termelnek, ezek közül az *Aspergillus ficuum* által termelt fitázról megállapították, hogy a legmagasabb specifikus aktivitással rendel-

kezik, valamint a hőstabilitása jobb, mint a más mikroorganizmusok által termelt fitázoké [van Gorcom et al., 89202436.5 számú Európai szabadalmi bejelentés, publikációs száma 0 420 358, 1989. szeptember 27.].

- 5 A fitázok számos növényfajban jelen vannak [lásd Loewus, F. A., In: *Plant Biology*, 9: „Inositol metabolism in plants” (eds. D. J. Morré, W. F. Boss, F. A. Loewus) 13]. Gellatly, K. S. and Lefebvre, D. D., *Plant Physiology* (supplement), 93, abstract 562) említik a burgonyagumókból izolált és jellemzett fitáz cDNS klónt. Gibson, D. M. et al., és Christen, A. A. et al., (*J. Cell Biochem.*, 12C, L407-es, illetve L402-es absztrak-
- 10 tok) említik az endogén fitáz szintézisét a szójabab magvak csírázása során. A növényi fitázok azonban rendszerint nem termelődnek elegendő mennyiségben ahhoz, hogy az ipari folyamatokban felhasználhatók legyenek.

Azt az elképzelést, hogy mikrobiális fitázt kell adni az egyszerű gyomrú állatok táplálékához, már korábban leírták [Ware, J. H., Bluff, L. and Shieh, T. R., 3 297 548 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Nelson, T. S., Shieh, T. R., Wodzinski, R. J. and Ware, J. H., *J. Nutrition* 101, 1289 (1971)]. A mai napig azonban ezt az elképzelést nem lehetett kereskedelmileg kiaknázni, mivel a mikrobiális enzimek előállítási költsége magas [Y. W. Han, *Animal Feed Sci. and Technol.*, 24, 345 (1989)]. Gazdasági okok miatt a szerves foszfort tovább adagolják az egyszerű gyomrú állatok táplálékához.

- 20 A fitázok egyéb ipari felhasználását is megtalálták. Egy ilyen alkalmazás például egy olyan ipari eljárás, amely során a keményítőt lisztes magvakból, például kukoricából és búzából állítják elő. A melléktermékeket, amelyek például a kukorica glutánt tartalmazzák egy ilyen nedves őrlési eljárásból, állati tápláléknak adják el. Az áztatási eljárás során fitázt adhatunk a rendszerhez. A körülmények ($T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=5,5$) ideálisak a gomba fitázok számára (lásd például a 0 321 004 számú, az Alko Ltd. cégnek megadott Európai szabadalmi be-
- 35 lentést). Előnyösen, az említett eljárás melléktermékeiből származó állati tápanyagok fitát helyett foszfátot fognak tartalmazni.

Az a vélemény is kialakult, hogy a fitázokat a szójafeldolgozásban is lehet alkalmazni (lásd Finase TM enzimek, Alko, az Alko Ltd. által kiadott termékinformációs broszúra, Rajamäki, Finnország). A szójaliszt nagy mennyiséget tartalmaz a táplálkozás szempontjából káros fitátból, ami ezt a fehérjeforrást alkalmatlanná teszi arra, hogy csecsemők táplálására, halak, borjak, és egyéb nem kérődző állatok etetésére használják. Ennek az értékes fehérjének az enzim javítása megnöveli ennek az anyagnak a tápértékét, valamint a kereskedelmi értékét.

- 55 Annak a lehetőségét vizsgáljuk, hogy értékes fehérjék előállítására transzgenikus növények használhatók-e. A pillanatnyilag ismert példák az interferon előállításához dohányban [Goodman, R. M., Knauf, V. C., Houck, C. M. and Comai, L., PCT/WO 87/00 865 (1987)], enkefalinok előállítása dohányban (*Brassica napus* és *Arabidopsis thaliana*) [Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Van
- 60

Lijsebettens, M., Botterman, J., Deblock, M., DeClerq, A., Leemans, J., Van Montagu, M. and Krebbers, E., *Bio/Technol.*, 7, 929 (1989)], antitestek előállítása dohányban [Hiatt, A., Cafferkey, R. and Boedish, K., *Nature*, 342, 76 (1990)], valamint humán szérum-albumin előállítása dohányban és burgonyában [Sijmons P. C., Dekker, B. M. M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T. C., van den Elzen, P. J. M. and Hoekema, A., *Bio/Technol.*, 8, 217 (1990)].

A gyakorlatban egyre növekvő számú növényfaj transzformációja, főleg a kétszikű fajoké (például a dohány, burgonya, paradicsom, *Petúnia*, *Brassica*) rutin eljárássá vált a szakterületen jártas szakemberek számára [Klee, H., Horsch, R. and Rogers, S., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 38, 467, (1987); Gasser, C. S. and Fraley, R. T., *Science*, 244, 1293 (1989)]. Az idegen gének növényekben való expressziójának stratégiája jól megalapozottá vált [Gasser, C. S. and Fraley, R. T., *Science*, 244, 1293 (1989)]. Növényi gének szabályozó szekvenciáit azonosították, amelyeket felhasználtak olyan kiméra gének készítésére, amelyeket expresszálni lehet növényekben és növényi sejtekben.

A gén-konstrukciók növényekbe való bevezetéséhez számos technológia ismert, például az *Agrobacterium tumefaciens* vagy *Agrobacterium rhizogenes*-szel való transzformáció. Ezt a stratégiát alkalmazva számos növényi szövetet használtak fel, a választás nagymértékben függött a növényfajtól és szövet-típusától való elérhetőségétől. A sikeres példák közé tartoznak a protoplasztok, mikroszporák vagy pollenek, valamint az explantumok, úgymint a levelek, szárazak, gyökerek, hipokotilok és kotilok transzformációi. Emellett használják a DNS direkt bejuttatási módszerét protoplasztokba és növényi sejtekbe vagy szövetekbe, például a mikroinjektálást, elektroporációt, részecske bombázást és közvetlen DNS-felvételt [Gasser, C. S. and Fraley, R. T., *Science*, 244, 1293 (1989)].

Fehérjéket a növényi magvakban számos különböző expressziós rendszerrel elő lehet állítani. Például, egy konstitutív promotor, úgymint a karfiol mozaikvírus (CaMV) [Guilley, H., Dudley, R. K., Jonard, Balazs, E. and Richards, K. E., *Cell*, 30, 763 (1982)] 35S promotere azt eredményezi, hogy az expresszált fehérje felhalmozódik a magvakban, többek között a transzgenikus növényekben. Egy másik módszer szerint szövet-specifikus és állapot-specifikus módon expresszálandó fehérjék génjeinek promotereit használhatjuk [Higgins, T. J. V., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35, 191 (1984); Shotwell, M. A. and Larkins, B. A., In: *The Biochemistry of plants*, 15, (Academic Press, San Diego: Stumpf, P. K. and Conn, E. E., eds), 297 (1989)], azaz a gének csak a kiválasztott szövetben expresszálnak, és csak a kiválasztott fejlődési állapotban.

Az nyilvánvaló, hogy a fitáz gazdaságos ipari méretű előállítása jelentős előnyt jelentene, többek között az állati tápok készítő iparágak. Ezért a találmány célja eljárás kidolgozása a fitáz gazdaságosabb előállítására rekombináns DNS technikák alkalmazásával olyan transzgenikus növények vagy növényi szervek előállítására, amelyek a fitáz megnövelt mennyiségben képesek

kifejezni, és amelyeket azután úgy, ahogy vannak, hozzá lehet adni az állatok táplálékához vagy tápjához, abból a célból, hogy az állatok közvetlenül elfogyasszák. Egy másik módszer szerint a találmány szerint előállított transzgenikus növényekben vagy növényi szervekben expresszálandó fitázt ki lehet extrahálni, és ha szükséges, akkor a kívánt alkalmazás céljára tisztítani lehet.

A találmány tárgya eljárás megnövekedett mennyiségű fitázt tartalmazó transzgenikus növények vagy növényi szervek előállítására, melynek során egy növényi gazdaszervezetet olyan expressziós konstrukcióval transzformálunk, amely egy fitázt kódoló, mikrobiális forrásból származó DNS-szekvenciát tartalmaz a fitáz növényben való expresszióját vezérlő szabályozó szekvenciákhoz működőképesen kapcsolva, majd a transzformált növényt a fitázt kódoló DNS-szekvencia kifejeződését biztosító körülmények között növesztjük. Az expressziós konstrukció olyan szabályozó szekvenciákat tartalmaz, amelyek konstitutíven és/vagy szövetspecifikus módon irányítják a fitáz expresszióját a növényekben, a növénytől vagy annak részétől függő módon.

A találmány továbbá a fenti expressziós konstrukció előállítására is vonatkozik, amely abban áll, hogy a fitázt kódoló DNS-szekvenciát működőképesen hozzákapcsoljuk egy olyan szabályozó szekvenciához, amely képes a fitáz konstitutív vagy szövetspecifikus expresszióját egy növényi gazdaszervezetben irányítani.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy vektor előállítására szolgáló eljárás, melynek során az ilyen expressziós konstrukciót egy alkalmas vektorba inszertáljuk.

A találmány továbbá a fenti vektorral transzformált baktériumtörzs előállítására is vonatkozik.

A találmány tárgyát képezi egy fitáz előállítására szolgáló eljárás is, amely abban áll, hogy

(i) egy növényi gazdaszervezetet egy olyan expressziós konstrukcióval transzformálunk, amely a mikrobiális eredetű, fitázt kódoló DNS-szekvenciát olyan szabályozó szekvenciákhoz kapcsolva tartalmazza, amely képes a növényi gazdában megnövekedett mennyiségű fitáz expresszióját vezérelni, majd a transzformált növényt a fitázt kódoló DNS-szekvencia expresszióját a növényi szövetben biztosító körülmények között növesztjük; és

(ii) a fitázt a transzgenikus növényi szövetből extraháljuk.

A találmány szerint előállított transzgenikus növények vagy növényi szervek, valamint az expresszált fitáz számos ipari folyamatban alkalmazhatók, például állati táplálékban vagy tápokban az állatok növekedésének elősegítésére; vagy a fitát inozittá és szervesen foszfáttá való átalakítására és ezáltal a fitát szintjének csökkentésére az állati trágyában. Az erre szolgáló eljárások és tápkészítmények előállítása is a találmány tárgyát képezik.

Az ábrák ismertetése:

1. ábra: A fitáz cDNS klónozásának stratégiája.

2. ábra: A fitáz cDNS fragmens transzlálódó régiójának nukleotid szekvenciája, valamint az ebből származtatott fitáz fehérje aminosav

- sorrendje; az érett fitáz fehérje kezdetét +1 jelzi.
3. ábra: A pMOG23 bináris vektor.
4. ábra: A klónozásnál alkalmazott szintetikus oligonukleotid duplexek.
5. ábra: A pMOG29 plazmid. A pUC18 plazmid, amely egy expressziós kazettát tartalmaz növényekben való konstitutív expresszió céljából, valamint egy dohány szignál-peptidet.
6. ábra: A fitázt tartalmazó öröklött magvak hozzáadásának hatása a szerves foszfor fitátból való felszabadulására.
7. ábra: Az *Aspergillus* fitáz dózis-hatás összefüggése egy *in vitro* emésztési modellben.
8. ábra: Az *Aspergillus* fitáz és dohánymagban található fitáz dózis-hatás összefüggése egy *in vitro* emésztési modellben.

A találmány szerint olyan transzgenikus növényeket vagy növényi szerveket állítunk elő, amelyek fitázt termelnek. Ezt úgy érjük el, hogy a növénybe egy fitáz aktivitással rendelkező fehérjét kódoló DNS szekvenciát juttatunk be.

A találmány szerint olyan DNS expressziós konstrukciókat állítunk elő, amelyek képesek egy fitázt kódoló génnel stabilan transzformálni egy növényt. Ezek a konstrukciók tartalmaznak egy fitázt kódoló DNS szekvenciát, amelyet működőképesen olyan szabályozó szekvenciákhoz kapcsolunk, amelyek képesek a fitáz expresszióját szabályozni. Ezek a szabályozó szekvenciák tartalmazhatnak olyan szekvenciákat is, amelyek a transzkripciót a növényekben vagy konstitutíven, és/vagy szövetspecifikus módon vezérlik, a növénytől vagy annak kiválasztott részétől függetlenül.

A találmány szerinti expressziós konstrukciók beépíthetők egy vektorba, előnyösen egy plazmidba, amelyet a kiválasztott növényi gazdaszervezet baktériumok által közvetített transzformálására használunk. Az expressziós konstrukciót ezután előnyösen integráljuk a növényi gazdaszervezet genomjába.

A találmány szövegében a „fitáz” kifejezés alatt olyan enzimsaladot értünk, amelynek tagjai katalizálják a szerves foszfor felszabadulását különböző mioinozitol-foszfátokból. Nyilvánvaló, hogy az összes, fitáz aktivitással rendelkező fehérjét ide értjük.

A fitázt kódoló DNS szekvenciát számos különböző forrásból előállíthatjuk, azaz mikrobiális, növényi vagy állati forrásból. A találmány szerinti eljárásban alkalmazott DNS szekvenciát mikrobiális forrásból állítjuk elő, például az *Aspergillus* fonalas gombából. A legelőnyösebb DNS szekvenciákat *Aspergillus ficuum*-ból, *Aspergillus niger*-ből, *Aspergillus awamori*-ból és *Aspergillus nidulans*-ból állítjuk elő.

Egy fitáz fehérjét kódoló gén vagy cDNS klónozását különböző módszerekkel végezhetjük. Az egyik módszer a fitáz fehérje tisztítása, ezt követi az N-terminális, valamint számos belső aminosavszekvencia meghatározása, és a fitázt termelő szervezet egy genomiális vagy cDNS könyvtárának átvizsgálása, az aminosav szekvencián alapuló próba alkalmazásával.

Ha a gén szekvenciájának csak egy része is ismert, akkor ezt az információt felhasználhatjuk a megfelelő cDNS klónozására, például a polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával [PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, (1989), H. A. Ehrlich, ed., Stockton Press, New York].

Az nyilvánvaló a szakterületen jártas szakember számára, hogy az előzőekben ismertetett klónozott fitáz gént használhatjuk heterológ hibridizálási kísérletekben, amelyek célja a fitázt kódoló gének izolálása más mikroorganizmusokból.

Egy másik szempont, hogy a fentiekben ismertetett, klónozott fitáz gént felhasználhatjuk úgynevezett „második generációs” fitáz gének előállításánál kiindulási anyagnak. A „második generációs” fitázok olyan fitázok, amelyeket mutagenézis technikákkal megváltoztattunk (például helyspecifikus mutagenézissel), és tulajdonságaik eltérnek a vad típusú fitázokétól, vagy rekombináns fitázok, például amelyeket találmányunk szerint állítunk elő. Megváltoztathatjuk például a hőmérséklet vagy pH-optimumot, a specifikus aktivitást vagy a szubsztrát affinitást úgy, hogy jobban illeszkedjen egy meghatározott eljárásban való alkalmazáshoz.

A fitázt kódoló cDNS izolálása lehetővé teszi olyan expressziós konstrukció készítését, amely képes a fitáz termelését irányítani a kiválasztott növényi gazdaszervezetben rekombináns DNS technikák alkalmazásával, például a szabályozó elemek, úgymint a promoterek, szekréciós jelek vagy ezek kombinációinak cseréjével.

A fitázt konstitutíven elő lehet állítani a transzgenikus növényekben mindegyik fejlődési állapotban. A használt növénytől vagy növényi szervtől függően az enzimeket fejlődési állapot-függő módon expresszálhatjuk, például a gumóképződés során, vagy a gyümölcs fejlődése során. Emellett, a felhasználástól függetlenül, az enzimeket szövetspecifikusan is expresszálhatjuk, például növényi szervekben, például gyümölcsben, gumókban, levelekben vagy magvakban.

A transzgenikus növények közé, amint azt a találmány szövegében meghatároztuk, azok a növények (valamint az említett növények részei és sejtjei) és utódaik tartoznak, amelyeket genetikailag módosítottunk rekombináns DNS technikák alkalmazásával, hogy a kiválasztott növényben vagy növényi szervben a fitáz expresszióját okozzuk vagy megnöveljük.

A találmányi leírás szövegében a „megnövekedett mennyiségű fitáz” specifikusan egy statisztikusan szignifikáns mennyiségű növényi szövetre vonatkozik, amely átlagban statisztikusan szignifikáns módon nagyobb mennyiségű fitáz enzimet tartalmaz, mint a nem-módosított növényi szövet azonos mennyisége.

A találmányi leírás szövegében a kiválasztható növények közé tartoznak, de nem korlátozzuk magunkat ezekre, az ehhez virágokat tartalmazó termények, például a karfiol (*Brassica oleracea*), az articsóka (*Cynara Scolymus*), gyümölcsök, például az alma (*Malus*, például *domesticus*), banán (*Musa*, például *acuminata*), bogyósok (úgymint a ribizli, *Ribes*, például a *rubrum*), a cseresznyék (például az édes cseresznye, *Prunus* például *avium*), uborka (*Cucumis*, például *sativus*), szőlő

(*Vitis*, például *vinifera*), citrom (*Citrus limon*), dinnye (*Cucumis melo*), diók (úgy mint a dió, *Juglans*, például a regia; a földimogyó, *Arachis hypogaea*), narancs (*Citrus*, például *maxima*), barack (*Prunus*, például *persica*), körte (*Pyrus*, például *Communis*), szilva (*Prunus*, például *domestica*), eper (*Fragaria*, például *moschata*), paradicsom (*Lycopersicon*, például *esculentum*), levelek, úgymint a lucerna (*Medicago*, például *sativa*), káposztafélék (például a *Brassica oleracea*), cikória (*cichoreum*, például *endivia*), póréhagyma (*Allium*, például *porrum*), saláta (*Lactuca*, például *sativa*), spenót (*Spinacia*, például *oleraceae*), dohány (*Nicotiana*, például *tabacum*), gyökerek, úgymint a nyílgyökér (*Maranta*, például *arundinacea*), répák (*Beta*, például *vulgaris*), sárgarépa (*Daucus*, például *carota*), kasszava (*Manihot*, például *esculenta*), tarlórépa (*Brassica*, például *rapa*), retek (*Raphanus*, például *sativus*), jam (*Dioscorea*, például *esculenta*), édesburgonya (*Ipomoea batatas*) és magvak, úgymint babok (*Phaseolus*, például *vulgaris*), borsó (*Pisum*, például *sativum*) szójabab (*Glycin*, például *max*), búza (*Triticum*, például *aestivum*), árpa (*Hordeum*, például *max*), kukorica (*Zea*, például *mays*), rizs (*Oryza*, például *sativa*), repcemag (*Brassica napus*), köles (*Panicum L.*), napraforgó (*Helianthus annuus*), zabok (*Avena sativa*), gumók, úgymint a karalábé (*Brassica*, például *oleraceae*), burgonya (*Solanum*, például *tuberosum*) és a hasonló.

A növényfaj megválasztását elsődlegesen a növény vagy növényi rész célzott felhasználása, valamint a növény transzformálhatósága határozza meg.

Számos technika ismert a számunkra fontos enzimet kódoló expressziós konstrukciót tartalmazó DNS szekvenciának a kiválasztott növénybe való bejuttatására. Ezek közé a technikák közé tartozik (anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat) a protoplasztok transzformálása a kalcium/polietilén-glikol módszerrel, az elektroporáció és mikroinjektálás, vagy a (borított) részecskékel való bombázás [Potrykus, I. *Bio/Technol.*, 8, 535 (1990)].

Ezek mellett az úgynevezett közvetlen DNS-transzformációs módszerek mellett számos, vektorokon alapuló transzformációs rendszer is széles körben elterjedt, például a virális vektorokon [azaz a karfiol mozaik víruson (*CaMV*)] és bakteriális vektorokon (azaz az *Agrobacterium* fajba tartozó plazmidokon) alapuló transzformáció [Potrykus, 1990]. A szelektálás és/vagy átvizsgálás után a transzformált protoplasztokat, sejteket és növényi részeket teljes növényekké regenerálhatjuk, a szakterületen ismert módszerek alkalmazásával [Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T., *Science*, 227, 1229 (1985)]. A transzformációs és/vagy regenerációs technikák megválasztása a jelen találmány szempontjából nem kritikus.

A kétszikűeknél a jelen találmány egy előnyös kiviteli alakja tartalmazza egy bináris vektorrendszer alkalmazását [(Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperort, R. A., *Nature*, 303, 179 (1983); Schilperort, R. A. Hoekema, A. and Hooykaas, P. J. J.,

European Patent Application No. 0 120 516 (1984)], amelyben olyan *Agrobacterium* törzseket alkalmazunk, amelyek a virulencia géneket tartalmazó *vir* plazmidot hordozzák, valamint egy kompatibilis plazmidot, amely az átvendő gén-konstrukciót tartalmazza. Ez a vektor mind *Escherichia coli*-ban, mind *Agrobacterium*-ban képes szaporodni, és a Bin19 bináris vektorból származik [Bevan, M. *Nucl. Acids. Res.* 12, 8711 (1984)], amelyet a találmány szempontjából lényegtelen módon változtattunk meg. Az ebben a példában alkalmazott bináris vektorok a T-DNS baloldali és jobboldali határoló szekvenciái között egy kanamicin rezisztenciát kódoló azonos NPTII-gént tartalmaznak [Bevan, M. *Nucl. Acids. Res.* 12, 8711 (1984)], valamint egy többszörös klónozó helyet, ahova a kívánt génkonstrukciókat klónozni lehet.

Az egyszikű növények transzformálása és regenerálása nem egy standard eljárás. Az újabb tudományos eredmények azonban azt mutatják, hogy elvileg az egyszikűek transzformálhatók, és a transzformált sejtekből transzgenikus növények regenerálhatók. Az ezen növényekre kidolgozott reprodukálható szövettenyésztő rendszerek fejlődése, a genetikai anyagnak a növényekbe való bejuttatására kidolgozott hatékony módszerek megkönnyítették a transzformációt. Jelenleg az egyszikűek transzformálására választható módszerek közé tartozik az explantumok vagy szuszpenziós sejtek mikroprojektil bombázása, valamint a protoplasztok közvetlen DNS felvétele vagy elektroporációja. Például transzgenikus rizsnövényeket sikeresen állítottak elő a bakteriális *hph* (higromicin rezisztenciát kódoló) gén szelekciós markerként való alkalmazásával. A gént elektroporációval juttaták be [Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. Fujimoto, H., *Nature*, 338, 274 (1989)]. Transzgenikus kukorica növényeket úgy állítottak elő, hogy a *Streptomyces hygroscopicus bar* génjét, amely foszfinotricin-acil-transzferázt kódol (ez az enzim inaktíválja a foszfinotricin nevű herbicidet) kukorica szuszpenziós tenyészet embriogén sejtjeibe juttatták be mikrorészecske bombázással [(Gordon-Kamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., O'Brien, J. V., Chambers, S. A., Adams Jr., W. R., Willets, N. G., Rice, T. B., Mackey, C. J., Krueger, R. W., Kausch, A. P. and Lemaux, P. G., *The Plant Cell*, 2, 603 (1990)]. A genetikai anyag bejuttatását más egyszikű növények, például búza és árpa aleuron protoplasztjaiba már közölték [Lee, B., Murdoch, K. Topping, J., Kreis, M. and Jones, M. G. K., *Plant Mol. Biol.*, 13, 21 (1989)]. A búzanövényeket embriogén szuszpenziós tenyészetből szelektálták, oly módon, hogy csak az idős kompakt és noduláris embriogén kalluszöveteket szelektálták az embriogén szuszpenziós tenyészet létrehozásához [Vasil, V., Readway, F. and Vasil, I. K., *Bio/Technol.*, 8, 429 (1990)]. Az ezekre az egyszikű növényekre kidolgozott transzformációs rendszereknek a kombinálása lehetővé teszi a jelen találmány alkalmazását egyszikű növényekre. Ezek a módszerek alkalmasak kétszikűek transzformálására és regenerálására is.

A fitáz konstrukciók növényekben való expressziója olyan részleteket is magában foglal, mint a gén transz-

kripciója a növényi polimerázokkal, a mRNS translációja stb., amelyek a rekombináns DNS szakterületen jártas szakemberek számára ismertek. Az alábbiakban csak a találmány kellő szintű megértéséhez szükséges részleteket tárgyaljuk.

Azokat a szabályozó szekvenciákat használhatjuk a találmányban, amelyekről ismert, vagy úgy találták, hogy a fitáz expresszióját okozzák. A szabályozó szekvenciák megválasztása függ a megcélzott terménytől és/vagy a megcélzott szervtől. Ezeket a szabályozó szekvenciákat növényekből vagy növényi vírusokból állíthatjuk elő, vagy kémiai szintetizálhatók. Ezek a szabályozó szekvenciák növényi transzkripció szabályozásában aktív promoterek, akár konstitutív, akár szövetspecifikus módon, a használt növénytől vagy növényi résztől függően. Ezek közé a promoterek közé tartoznak a konstitutíven expresszálódó gének promoterei, például a CaMV (karfiol mozaikvírus) 35S promotere [Guilley et al., *Cell*, 30, 763 (1982)], a levélspecifikus expresszió promoterei, például a biszfoszfát-karboxiláz kis alegység génjéé [Coruzzi et al., *EMBO J.*, 3, 1671 (1984)], a gyökérspecifikus expresszió promoterei, például a glutamin-szintetáz gén promotere [Tingey et al., *EMBO J.*, 6, 3565 (1987)], a magspecifikus expresszió promoterei, például a kruciferin A promotor *Brassica napus*-ból [Ryan et al., *Nucl. Acids. Res.* 17, 3584 (1989)], a gumóspecifikus expresszió promoterei, például az I-es osztályú patatin promotor burgonyából [Rocha-Sosa et al., *EMBO J.*, 8, 23 (1989); Wenzler et al., *Plant Mol. Biol.*, 12, 41 (1989)], vagy a gyümölcsspecifikus expresszió promoterei, például a poligalakturonidáz (PG) promotor paradicsomból [Bird et al., *Plant Mol. Biol.*, 11, 651 (1988)].

A többi szabályozó szekvencia, úgymint a terminátor szekvencia és poliadenilezési szignál, beleértve minden, növényben így működő szekvenciát, a szakember számára ismert. A példák közé tartozik az *Agrobacterium tumefaciens* nopalín szintetáz génjének 3' határoló régiója [Bevan, M., *Nucl. Acids. Res.* 12, 8711 (1984)].

A szabályozó szekvenciák tartalmazhatnak enhanszer szekvenciákat is, például olyanokat is, amelyeket a CaMV 35S promotorében találtak, és mRNS stabilizáló szekvenciákat, amilyen például a lucerna mozaikvírus (AIMV) RN4 leader szekvenciája [Brederode et al., 1980], vagy bármely más, az említett módon működő szekvencia.

A fitázt olyan környezetben kell expresszálni, amely az expresszált fehérje optimális stabilitását biztosítja. A sejt-kompartment megválasztását, például azt, hogy legyen az a citoszol, endoplazmatikus retikulum, vakuólum, fehérjetest vagy periplazmatikus tér, használhatjuk a találmányban arra, hogy egy ilyen stabil környezetet hozzunk létre, a fitáz biofizikai paramétereitől függően. Az ilyen paraméterek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a pH optimum, a proteázokra való érzéketlenség vagy az előnyös kompartment molaritására való érzékenység.

A sejt citoplazmájában való expresszió eléréséhez az expresszált enzim nem tartalmazhat szekréciós

szignálpeptidet, vagy bármely más célszekvenciát. A kloroplasztokban vagy mitokondriumokban való expresszió céljából az expresszált enzimnek egy úgynevezett tranzit-peptidet kell tartalmaznia, hogy ezekbe a sejtszervekbe bejussanak. Azok a célszekvenciák, amelyeket hozzá lehet kapcsolni ezekhez, már ismertek [Smeekens et al., *TIBS*, 15, 73 (1990); van den Broeck et al., *Nature*, 313, 358 (1985); Schreier et al., *EMBO J.*, 4, 24 (1985)]. Ha az enzim aktivitására a vakuólumban van szükség, akkor egy szekréciós szignálnak is jelen kell lennie, valamint egy specifikus célzó szekvenciának, amely ezeket az enzimeket ezekbe a vakuólumokba irányítja [Tauge et al., *Plant Phys.* 86, 506 (1988)]. Ugyanez igaz a magvakban levő fehérjetestekre is. A számunkra fontos enzimet kódoló DNS szekvenciát úgy kell módosítani, hogy az enzim a sejten belül a megfelelő helyen tudja kifejteni a hatását.

A fitáz extracelluláris expressziójának eléréséhez a találmány szerinti expressziós konstrukció egy szekréciós szignálszekvenciát használ. Jóllehet a növényfaj számára homológ (natív) szignálszekvenciák előnyösek, a heterológ szignálszekvenciák, azaz a más növényfajból származó vagy mikrobiális eredetűek is használhatók. Az ilyen szignálszekvenciák ismertek a szakterületen jártas szakemberek számára. A találmány szerinti eljárás során alkalmazható, megfelelő szignálszekvenciákat leírták már [Walter, P. and Blobel, G., *Biochem. Soc. Symp.*, 47, 183 (1986); Von Heijne, G., *J. Mol. Biol.*, 189, 239 (1986); and Sijmons, P. C., Dekker, B. M. M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T. C., van den Elzen, P. J. M. and Hoekema, A., *Bio/Technol.*, 8, 217 (1990)].

A találmány szerinti megfelelő DNS konstrukciók minden elemét (promoterek, szekretáló, stabilizáló, célzó vagy terminációs szekvenciák) módosíthatjuk, ha szükséges, hogy befolyásoljuk a szabályozás jellegét, a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerrel.

A találmány szerint előállított fitáztartalmú növényeket felhasználhatjuk arra, hogy magasabb fitáztartalmú növényeket vagy növényi szerveket állítsunk elő. Lehetséges például, hogy szomaklonális variációs technikákkal vagy keresztezési technikákkal állítsunk elő ilyen növényeket. Egy szakember számára jól ismertek az ilyen technikák.

A találmány egy előnyös megvalósítási formája szerint egy kétszálú, fitázt kódoló kétszálú cDNS-t állítunk elő *Aspergillus ficuum*-ból izolált mRNS alapján (van Gorcon et al., 1991). A DNS konstrukciót a *Brassica napus* kruciferin nevű 12S tartalék fehérjére szabályozó szekvenciájának irányítása alá helyezzük. A konstrukciót ezután egy bináris vektorba, például a pMOG23-ba klónozzuk (*Escherichia coli* K-12 DH5 α törzsben letétbe helyezve, Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands, 1990. január 29-én CBS 102.90 letéti szám alatt). Ezt a vektort bejuttatjuk *Agrobacterium tumefaciens*-be, amely egy gyengített Ti plazmidot tartalmaz. Az ezt a konstrukciót tartalmazó baktérium sejteket együtt tenyésztjük dohányból vagy *Brassica* növényekből származó szövetekkel, majd a transzformált növényeket antibiotikumokat tartalmazó

táptalajon szelektáljuk, és arra indukáljuk, hogy az adott táptalajon differenciálódott növényekké regenerálódjanak. A keletkező növények olyan magvakat termelnek, amelyek tartalmazzák és expresszálják a DNS konstrukciót.

A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a fitázt kódoló DNS konstrukciót a karfiol mozaikvírus (CaMV) 35S promotoréból származó szabályozó szekvencia irányítása alá helyezzük. A konstrukciót ezután egy bináris vektorba szubklónozzuk. Ezt a vektort bejuttatjuk *Agrobacterium tumefaciens*-be, amely egy legyengített Ti plazmidot tartalmaz. Az ezt a konstrukciót tartalmazó baktériumsejteket együtt tenyésztjük dohányból vagy *Brassica* növényekből származó szövetekkel, majd a transzformált növényi sejteket antibiotikumokat tartalmazó táptalajon növesztjük, majd arra indukáljuk, hogy ezen a táptalajon differenciálódott növényekké regenerálódjanak. A kapott növények tartalmazzák és konstitutíven expresszálják a DNS konstrukciót.

A fitáz aktivitást számos különböző módszerrel megmérhetjük, ezek megválasztása nem kritikus a jelen találmány szempontjából. A transzgenikus növényi szövetek fitáz aktivitását megmérhetjük például ELISA módszerrel, Western blot módszerrel, vagy közvetlen enzimmérési módszerrel, kolorimetriás technikák vagy natív gél vizsgálati módszer alkalmazásával.

A fitázt tartalmazó növényt vagy növényi szervet, amint azt a jelen találmány szerint előállítottuk, számos, fitázműködést igénylő ipari folyamatban alkalmazhatjuk.

A találmány szerint előállított, fitázt tartalmazó növényeket vagy növényi szerveket fel lehet használni az ipari folyamatokban, például nem kérődző állatok esetében tápadalékként, a szója feldolgozásában vagy az inozit, illetve inozit-foszfát fitátból való előállításában. Más fitáttartalmú szubsztrátot használó ipari folyamat is van, például a keményítőipar és a fermentációs ipar. A fémionok fitát által okozott kelációja okozhatja azt, hogy ezek az ásványi anyagok nem hozzáférhetők a termelő mikroorganizmusok számára. A fitát enzimatikus hidrolízise megelőzi ezt a problémát.

A növényekben előállított fitázt alkalmazni lehet a kukorica vagy cirok áztatása során. A növényi szövetet meg lehet őrölni, mielőtt az áztatott kukoricához adnánk. A magvakból felszabadított fitáz működhethet a fitinen, amely számos kukorica-készítményben jelen van. A fitin lebomlása az áztatott kukoricában előnyös a kukorica-ekvív kereskedelmi értéknövekedése szempontjából, mivel ezt állati tápként vagy mikrobiális fermentációk tápanyagaként lehet használni. Emellett, a fitin lebontása megelőzheti a kukorica-ekvív töményítése, szállítása és tárolása során fellépő lerakódások felhalmozódását a szűrőkön, csövekben, reaktorokban stb. (Vaara et al., 1989). A fitáz működése felgyorsíthatja a nedves kukorica őrlésében szerepet játszó áztatási folyamatokat és elválasztási folyamatokat.

A növényeket vagy növényi szerveket alkalmazhatjuk közvetlenül, azaz minden további feldolgozás nélkül, illetve először szokásos módon feldolgozva, azaz a kívánt konszisztenciára őrölve a feldolgozás előtt.

Egy másik módszer szerint a fitázt kivonhatjuk a növényből vagy növényi szervből, és ha szükséges, akkor felhasználás előtt szokásos extrahálási és tisztítási technikákkal tisztíthatjuk.

5 A fitázok előállítása olyan növényekben, amelyek kompatibilisek a szándékolt felhasználási területtel, kényelmet nyújt, és a mikrobiális eredetű fitázokhoz képest csökkenti a termelési költségeket, ezzel lehetővé teszi a gazdaságos alkalmazását például állati tápokban, és ez végül a szervesen foszfáttal versenyképes ár/in vivo teljesítményt eredményez. További előny, hogy lényegesen csökken a trágya foszfortartalma.

10 Nyilvánvaló, hogy a fitázok alkalmazása, a szervesen foszfáttal versenyképes ár mellett, megnöveli a tápkészítő ipar lehetőségeit a magas tápértékű tápok előállításán. Ha például a tápot fitázzal egészítjük ki, akkor nem kell szervesen foszfátot hozzáadni, és a különböző, fitáttartalmú anyagok mennyiségét megnövelhetjük.

15 Az alábbi példákat úgy adjuk meg, hogy a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember teljes leírást kapjon arról, hogyan kell a találmányt alkalmazni, és nem szándékozunk a találmány oltalmi körét csupán a példákra korlátozni. Erőfeszítéseket tettünk arra, hogy a használt számok pontosak legyenek (például a mennyiségek, hőmérséklet, pH stb. vonatkozásában), de kísérleti hibákat és eltéréseket figyelembe kell venni. Ha külön nem jelöljük, akkor a hőmérsékletet Celsius fokban adjuk meg, a nyomás pedig közel atmoszferikus.

1. példa:

*Poli-A⁺ RNS izolálása *Aspergillus ficuum*-ból*

35 Az *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 törzset az alábbi összetételű táptalajon növesztjük: 22,72 g/l kukoricaliszt (amilázzal kezelve pH=7-en, 85 °C-on 15 percig), 9,36 g/l glükóz, 2,9 g/l kálium-nitrát, 0,142 g/l kálium-klorid, 0,142 g/l mangán(II)-szulfát-7 víz és 56,8 mg/ml vas(II)-szulfát-7 víz. Hat nap elteltével a micéliumokat begyűjtjük.

40 0,5 g száraz micéliumot cseppfolyós nitrogénben lefagyaszunk, majd megőrünk. Ezt követően az anyagot Ultra Turrax-szal homogenizáljuk (teljes sebesség, 1 perc) 0 °C-on 3 M lízium-klorid, 6 M karbamid összetételű oldatban, majd éjszakán át 4 °C-on tartjuk. Auffray és Rougeon leírása szerint (1980). Az összes celluláris RNS-t úgy nyerjük ki, hogy 16000 × g-vel centrifugáljuk a szuszpenziót, majd kétszer extraháljuk egymás után fenol:kloroform:izoamil-alkohol (50:48:2) arányú elegyével. Az RNS-t etanollal kicsapjuk, majd 1 ml TRIS-HCl (pH=7,4), 0,5% SDS elegyben oldjuk. A poli A⁺ szelekcióhoz az össz-RNS-t tartalmazó min-
55 tát 5 percre 65 °C-ra melegítjük, 0,5 mM nátrium-klorid koncentrációt állítunk be, majd ezt követően oligo(dT)-cellulóz oszlopra visszük fel. Miután néhány-szor mostuk 10 mM TRIS (pH=7,0), 1 mM EDTA és 0,1 mM nátrium-klorid összetételű oldattal, a poli A⁺ RNS-t eluálás után (10 mM TRIS pH=7,0, 1 mM
60 EDTA eluálószer) összegyűjtjük.

2. példa:

A fitázt kódoló cDNS készítése és klónozása

A cDNS első láncának szintéziséhez 5 µg poli A⁺ RNS-t, amelyet az 1. példa szerint izoláltunk, 16,5 µl vízben oldunk, és az alábbi komponenseket adjuk hozzá: 2,5 µl Rnasin-t (30 E/µl), 10 µl puffert (összetétele: 50 mM TRIS-HCl pH=7,6, 6 mM magnézium-klorid, 40 mM kálium-klorid), 2 µl 1 mM kálium-klorid, 5 µl 0,1 mM DTT, 0,5 µl oligo(dT)₁₂₋₁₈ (2,5 mg/ml), 5 µl 8 mM dNTP keverék, 5 µl BSA (1 mg/ml) és 2,5 µl Moloney MLV reverz transzkriptáz (200 E/ml). Az elegyet 30 percig 37 °C-on inkubáljuk, majd a reakciót 10 µl 0,2 mM EDTA és 50 µl víz hozzáadásával állítjuk le. Ezután extraháljuk 110 µl kloroformot alkalmazva, majd miután 5 percig centrifugáltuk, 5 M ammónium-acetátot és 440 µl abszolút etanolt adunk hozzá (-20 °C-on). A kicsapást szárazjég/etanol oldatban végezzük 30 percig.

Miután lecentrifugáltuk (10 perc, 0 °C), a cDNS/mRNS csapadékot megszáritjuk, és 20 µl vízben oldjuk.

A fitázt kódoló cDNS izolálását polimeráz láncreakcióval (PCR) végezzük, két fragmentben. A két fragmentet kombináljuk, a génen belül található BamHI restrikciós hasítási hely alkalmazásával, így állítjuk elő

Oligo1: 5'GGGTAGAATTCAAAAATGGGCGTCTCTGCTGTTCTA 3'

Oligo2: 5'AGTGACGAATTCGTGCTGGTGGAGATGGTGTGCG 3'

Az amplifikált fragmentet EcoRI restrikciós enzimmel emésztjük, majd a pTZ18R (a Pharmaciánál vásárolható) plazmid EcoRI hasítási helyére klónozzuk. A restrikciós hely térképezése és a nukleotid szekvencia

Oligo3: 5'GAGCACCAAGCTGAAGGATCC 3'

Oligo4: 5'AACTGCAGGCGTTGAGTGTGATTGTTAAAGGG 3'

Az amplifikált fragmentet BamHI és PstI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd ezt követően BamHI és PstI restrikciós enzimekkel emésztett pTZ18R plazmidba klónozzuk. A restrikciós térképezés és szekvenálás azt mutatja, hogy a helyes fragmentet izoláltuk. A kapott plazmid jele pGB926.

Abból a célból, hogy teljes hosszúságú cDNS-t izoláljunk, a pGB925 plazmidot EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd a fitázt kódoló DNS-t izoláljuk. Ezt a fragmentet klónozzuk a pGB926 plazmidba, amelyet előzőleg EcoRI és BamHI restrikciós enzimmel emésztettünk, így kapjuk a pGB927 plazmidot. A pGB927 plazmid tartalmazza a fitázt kódoló teljes hosszúságú cDNS-t, mérete körülbelül 1,8 kb. A fitáz fehérjét kódoló cDNS régió szekvenciáját, valamint az ebből származtatott aminosavszekvenciát a 2. ábrán mutatjuk be.

3. példa:

A pMOG23 bináris vektor készítése

Ebben a példában a pMOG23 bináris vektor készítését írjuk le (Escherichia coli K12 DH5α törzsben, letétbe helyezve a Centraal Bureal voor Schimmelcultures-nél, 1990. január 29-én, CBS 102.90 letéti szám alatt).

a teljes hosszúságú cDNS-t. A fitáz cDNS klónozásának stratégiáját az 1. ábrán mutatjuk be.

A fitáz gén részleges szekvenálása (van Gorcom et al., 1991) egy BamHI restrikciós hasítási helyet mutat az iniciációs kodon után körülbelül 800 bázispárral. Az említett BamHI hasítási hely körüli BamHI nukleotid szekvenciát, valamint a fitáz gén start kodonját megelőző nukleotid szekvenciát és a stop kodonját követő nukleotid szekvenciát használjuk a PCR-ben használt oligonukleotid szekvenciák tervezéséhez.

A polimeráz láncreakciót a Taq polimeráz szállítója (Cetus) előírásai szerint végezzük 1,5 µl, az első lánc szintézisének reakciótermékét tartalmazó oldattal és 0,5–0,5 µg oligonukleotidot tartalmazó oldattal. Az amplifikálást egy DNS amplifikáló berendezésben végezzük (Perkin Elmer/Cetus) 25 ciklust végzünk (2 perc 94 °C, 2 perc 55 °C, 3 perc 72 °C), majd a reakcióelegyet fenol és kloroform extrakcióval fehérjementesítjük. A DNS-t kicsapjuk, feloldjuk egy pufferben (összetétele: 10 mM TRIS pH=7,0, 0,1 mM EDTA), majd ezt követően a megfelelő restrikciós enzimekkel emésztjük.

A fehérje N-terminális részét kódoló fragment amplifikálásához az alábbi két oligonukleotidot használjuk:

meghatározása igazolja, hogy a fragment megfelelő. A kapott plazmid jele pGB925.

A második fragment amplifikálásához az alábbi két oligonukleotidot használjuk:

A pMOG23 bináris vektor (2. ábra) a Bin19 vektor származéka (Bevan, M., 1984). A pMOG23 előállításához a Bin19 vektort oly módon változtatjuk meg, hogy az nem lényeges a jelen találmány szempontjából, a molekuláris biológia szakterületen jártas szakember számára ismert módszereket alkalmazva.

Elsőként a baloldali határoló szakaszt (LB) és a jobboldali határoló szakaszt (RB) cseréljük ki, a neomicin-foszfortranszferáz II gén (NPTII gén) alapján. Másodszor, az NPTII orientációját fordítjuk meg, ezzel az LB irányában kapunk transzkripciót. Végezetül, a Bin19-ben levő polilinkert helyettesítjük egy olyan polilinkerrel, amely az alábbi restrikciós enzim felismerési helyeket tartalmazza: EcoRI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, SacI, XhoI és HindIII.

4. példa:

Az Aspergillus ficuum fitáz cDNS-ének klónozása egy olyan expressziós konstrukcióban, amely konstitutív expressziót biztosít növényekben

Az Aspergillus ficuum fitáz génjét átalakítjuk, és egy olyan expressziós konstrukcióban klónozzuk, amely konstitutív expressziót biztosít a karfiol mozaikvírus 35S promotere után. Az expressziós konstrukció tartalmazza a növényi eredetű szignál-peptid szekvencia kódoló információját.

A fitáz cDNS-t a pMOG29 plazmidban levő (az a) pontban írjuk le) expressziós szerkezetbe klónozzuk. Ezt követően a teljes konstrukciót a pMOG23 bináris vektorba építjük be, majd átviesszük *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe.

a) A pMOG29 expressziós vektor készítése

A ROK1 expressziós konstrukciót [Baulcombe et al., *Nature*, 321, 336 (1986)] egy EcoRI/HindIII fragment formájában klónozzuk pUC18-ba. Ez a konstrukció tartalmazza a karfiol mozaikvírus (CaMV) 35S promoterét egy EcoRI/BamHI fragment formájában, valamint a nopalín szintetáz (nos) transzkripció terminátort egy BamHI/HindIII fragment formájában. A promoter fragment a CaMV 35S promoter –800-tól a +1-es nukleotidig terjedő szekvenciáját tartalmazza. A benne levő +1 pozíció a transzkripció iniciációs hely (Guilley et al., 1982). Az NcoI restrikciós hely előtt, a –512-es pozícióban levő szekvenciát deletáljuk, majd ezt a helyet egy EcoRI hasítási helyre változtatjuk. Ezt úgy hajtjuk végre, hogy a pUC18-ban levő expressziós konstrukciót NcoI-gyel hasítjuk. Az egyszerű végeket Klenow polimerázzal töltjük fel, majd EcoRI linkerrel ligáljuk. A kapott plazmidot EcoRI restrikciós enzimmal hasítjuk, ennek eredménye az eredeti NcoI hasítási hely előtt levő 35S promoter szekvenciákat hordozó EcoRI fragment deléciója. A BamHI/HindIII fragmentet, amely a nos terminátort tartalmazza, egy szintetikus DNS fragmenttel helyettesítjük (az A duplex oligonukleotid, 4. ábra), amely a lucerna mozaikvírus (AIMV) RNA4 leader szekvenciáját tartalmazza (Brerode et al., 1980). Ezt úgy hajtjuk végre, hogy először BamHI, majd HindIII restrikciós enzimmal hasítjuk, majd ligáljuk a szintetikus DNS fragmentet. A BamHI restrikciós helyet, és az előtte levő három nukleotidot helyspecifikus mutagenézissel távolítjuk el. A kapott plazmidba a nos terminátor szekvenciát tartalmazó BamHI/HindIII fragmentet újra beviesszük. A β -glükuronidáz kódoló gént [eredete a pRAJ 275 plazmid; Jefferson, R. A., *Plant Mol. Biol. Reporter*, 5, 387 (1987)] egy NcoI/BamHI fragment formájában ligáljuk, így kapjuk a pMOG14 plazmidot. A szakirodalomból ismert, hogy a –343 és –90 bázisok közötti szekvencia duplikálódása megnöveli a –35S promoter aktivitását [Kay, R., Chan, A., Dayly, M. and McPherson, J., *Science*, 236, 1299 (1987)]. Ahhoz, hogy egy promoter fragmentet egy dupla, úgynevezett enhanszer szekvenciával kapjunk meg, a következő, a szakterületen jártas szakember számára ismert lépéseket hajtjuk végre. A pMOG14 plazmidból az enhanszer fragmentet egy AccI/EcoRI fragment formájában izoláljuk, majd ezt követően Klenow polimerázzal tompavégűvé tesszük. A kapott fragmentet egy EcoRI restrikciós enzimmal hasított és tompavégűvé tett pMOG14 plazmidba juttatjuk be, oly módon, hogy a tompavégűvé tett EcoRI és AccI hasítási helyek egy új EcoRI hasítási helyet hoznak létre. A keletkező plazmid (pMOG18) a 35S promotert egy dupla enhanszer szekvenciával együtt tartalmazza, egy expressziós konstrukcióban levő AIMV RNA4 leader szekvenciával és a nos terminátorral együtt egy EcoRI/HindIII fragmen-

ten. Végezetül, a β -glükuronidáz kódoló NcoI/BamHI fragmentet a B szintetikus DNS fragmenttel helyettesítjük (4. ábra), amely a PROB12 cDNS-ből származik [Cornelissen, B. J. C., Hooft van Huijsduijnen, R. A. M. and Bol, J. F., *Nature*, 321, 531 (1986)]. Ez a B fragment a Samsun NN dohány PR fehérjéje PR–S szignál peptidjét kódolja. Egy nukleotid megváltoztatásával egy SphI hasítási helyet hozunk létre a szignál peptidet kódoló DNS szekvenciában. Ez a változtatás nem változtatja meg a kódolt PR–S szignál peptid aminosav szekvenciáját. A kapott plazmid jele pMOG29 (5. ábra).

b) Az *Aspergillus ficuum* fitáz génjének klónozása a bináris vektorban

A C jelű duplex oligonukleotidot (4. ábra) az SphI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztett pMOG29 plazmidba klónozzuk, így kapjuk a pMOG407 plazmidot. Az oligonukleotid duplex tartalmazza a PR–S szignálpeptid utolsó két aminosavát kódoló szekvenciát, majd ezt követően az érett fitáz első hat aminosavát kódoló információkat.

A pGB927 plazmidot, amely a teljes hosszúságú fitáz cDNS-t tartalmazza, részlegesen emésztjük XhoI, és teljesen megemésztjük PstI restrikciós enzimmal. Az érett fitáz 6. aminosavától kezdődően az érett fitáz kódoló DNS szakaszt tartalmazó XhoI/PstI fragmentet XhoI és PstI restrikciós enzimekkel linearizált pMOG407 plazmidba klónozzuk, így kapjuk a pMOG417 plazmidot. A teljes konstrukciót, amely a kiméra fitáz gént tartalmazza, egy EcoRI/HindIII fragment formájában beépítjük az EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel linearizált pMOG23 bináris vektorba. A kapott pMOG413 bináris plazmidot mobilizáljuk, egy háromszülős keresztezés során, az *Escherichia coli* K–12 RK2013 törzsszel (ez tartalmazza a pRK2013 plazmidot) [Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347 (1980)], *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe, amely a T DNS növénybe való transzferéhez szükséges virulencia géneket hordozó plazmidot tartalmazza.

5. példa:

Kiméra fitáz gén tranziens expressziója dohány protoplasztokban

Dohány protoplasztokat transzformálunk a konstitutív CaMV fitáz promoter szabályozása alatt álló kiméra fitáz gént tartalmazó plazmid DNS-sel. 72 óra elteltével a kezelt protoplasztokat megvizsgáljuk a bevitt fitáz gén tranziens expressziója szempontjából, a fitáz-aktivitás vizsgálatát alkalmazva.

A sterilen növesztett 1–2 hónapos dohányynövényekből (*Nicotiana tabacum* SR1) protoplasztokat készítünk. A teljes eljárást Rodenburg és munkatársai közlik [Rodenburg, K. W., DeGroot, M. J. A., Schilperort, R. A., Hooykaas, P. J. J., *Plant Mol. Biol.*, 13, 711 (1989)]. A transzformáláshoz 5×10^5 protoplasztot elektroporálunk 40 μ g pMOG417 plazmid DNS-sel. Az elektroporáció után a protoplasztokat ülepitjük, és 3 ml felülszót éjszakán át dializálunk fölös-

legben levő vízzel szemben. A dializátumot fagyasztva szárítjuk, majd 300 µl 25 mM nátrium-acetát pufferben (pH=5,5) szuszpendáljuk. A vizsgálatot ezután oly módon hajtjuk végre, amint az a 10. példában részletesen le van írva, azzal az egyetlen eltéréssel, hogy a 250 mM glicin-HCl puffer (pH=2,5) helyett 25 mM nátrium-acetát (pH=5,5) puffert használunk.

Ezekben a kísérletekben egy fitáz egységet úgy definiálunk, mint azt az enzim mennyiséget, amely 1,5 mM nátrium-fitát oldatból egy perc alatt 37 °C-on, pH=5,5-ön 1 µM foszfátot szabadít fel.

A kezeletlen protoplasztokban nincs kimutatható aktivitás. A pMOG417 plazmiddal elektroporált protoplasztok 0,26 PTU (fitáz egység, lásd a 10. példát) aktivitást mutatnak a felülszobában levő fehérje milligrammjára számítva.

6. példa:

Egy kiméra fitáz gén stabil expressziója dohánynövényekben, a CaMV 35S promoter szabályozása alatt

A dohányt úgy transzformáljuk, hogy növényi szövetet együtt tenyésztünk *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsszel, amely a CaMV 35S promoter szabályozása alatt levő kiméra fitáz gént hordozó pMOG413 bináris vektort tartalmazza. A transzformáció végrehajtásához dohány (Nicotiana tabacum) levélkorongokat tenyésztünk együtt Horsch és munkatársai módszerével (1985). A transzgenikus növényeket azokból a hajtásokból regeneráljuk, amelyek szelekciós táptalajon nőnek (100 mg/liter kanamicin), meggyökereztetjük őket, és talajra visszük át őket. A fiatal növényeknek vizsgáljuk az NPTII aktivitását (kanamicin rezisztencia), érettségig felneveljük őket, hagyjuk, hogy önmagukat beporozzák és magokat termeljenek.

Abból a célból, hogy meghatározzuk a transzgenikus magvakban található fitáz aktivitás mértékét, körülbelül 50 mg-os mennyiséget veszünk, és jéghideg morzsában eldörzsöljük 1 ml 25 mM nátrium-acetát pufferben (pH=5,5). A centrifugálás után a felülzót a tranziens vizsgálatoknál leírt módszerrel vizsgáljuk meg. 32 függetlenül transzformált dohánynövényben 2 PTU/mg összes oldható fehérje maximális aktivitást figyeltünk meg az extraktumokban. Ez megfelel 1,7% oldható összfehérjének. Ezeknek a transzformált dohánynövényeknek a magvaiban az összes oldható magfehérje 0,4%-át kitevő maximális fitázaktivitás figyelhető meg. A transzformálatlan növényekben nincs megfigyelhető fitázaktivitás.

Két transzgenikus növényvonalat a 413.25-öst és a 413.32-est választjuk ki, azon az alapon, hogy jól expresszálódik bennük a fitáz.

7. példa:

Az Aspergillus ficuum fitáz cDNS-ének klónozása egy magspecifikus expressziós konstrukcióban

Egy expressziós konstrukciót állítunk elő, oly módon, hogy magspecifikus expressziót kapjunk, a Brassica napus kruciferin 12S tartalék fehérje génjéből származó szekvenciákat alkalmazva (cruA; Ryan et

al., 1989). Ezeket a szekvenciákat hasonló magspecifikus génekből származó szekvenciákkal helyettesíthetjük, ezzel a jelen találmány tárgyával azonos célt érhetünk el.

- 5 A fitáz cDNS-t klónozzuk az expressziós konstrukcióba. Végül az egész konstrukciót bejuttatjuk *Agrobacterium tumefaciens*-be, amelyet a transzformáláshoz használunk. Bármely egyéb, számunkra fontos fehérje génjének vagy cDNS-ének klónozása esetében a klónozást lényegében ugyanúgy végezzük, mint ahogy az előzőekben a fitáz cDNS-re leírtuk.

Az ebben a példában említett összes *Escherichia coli* transzformáláshoz az *Escherichia coli* K-12 DH5α törzset használjuk.

- 15 a) *Az expressziós konstrukció előállítása*

A magspecifikus expresszióhoz használt expressziós konstrukció készítéséhez a Brassica napus cv. Jet Neuf kruciferin A (cruA) gén promoter és terminátor szekvenciáját PCR technológia alkalmazásával megsztetizáljuk izolált genomiális DNS-ről, mint templárról [Mettler, I. J., Plant Mol. Biol. Rep., 54, 346 (1987)]. Ez a gén magspecifikus expressziót mutat, kódoló, valamint határoló szekvenciáit meghatározták (Ryan et al., 1989).

- 25 Két oligonukleotid készletet szintetizálunk. Az egyik lehetővé teszi a cruA 5' határoló régió, valamint a szignál peptid kódoló szekvencia egy részének amplifikálását egy EcoRI/NcoI fragment formájában:
5' GTTCGGAATTCGGGTTCCGG 3' és
30 5' AACTGTTGAGCTGTAGAGCC 3'
A másik, a 3' határoló szekvenciának egy BglII/HindIII fragment formájában való amplifikálásához:
5' CTTAAGATCTTACCCAGTGA 3' és
5' CGGAGAAGCTTGCATCTCGT 3'

- 35 Az oligonukleotidokat úgy terveztük meg, hogy alkalmas restrikciós hasítási helyeket tartalmazzanak a végükön, hogy ezzel lehetővé váljon az expressziós konstrukció közvetlen összeállítása, a fragmentek restrikciós enzimekkel való emésztése után.

- 40 A cruA gén 5' fragmentjét, amely magában foglalja a szignál peptidet kódoló szekvencia 54 nukleotidját, az EcoRI és NcoI restrikciós enzimekkel hasított pMOG445 vektorba klónozzuk (E duplex oligonukleotid, 4. ábra, a pUC18 vektorba klónozva, SstI és EcoRI restrikciós enzimekkel linearizálva), így kapjuk a pMOG424 vektort. A D szintetikus duplex oligonukleotidot, amely tartalmazza a Brassica napus kruciferin szignál szekvenciájának utolsó 5 kódoló triplettjét, az érett fitáz 1–6 aminosavát kódoló szekvenciát, és egy többszörös klónozó helyet, az NcoI és HindIII restrikciós enzimekkel hasított pMOG424 vektorba klónozzuk. A kapott vektor jele pMOG425. A 3' cruA PCR fragmentet egy BglII/HindIII fragment formájában klónozzuk BglII és HindIII restrikciós enzimekkel emésztett pMOG425 plazmidba, így kapjuk a pMOG426 vektort.

- 55 b) *Az Aspergillus ficuum fitáz génjének klónozása a bináris vektorban*

- 60 A pGB497 plazmidot, amely az *Aspergillus ficuum* fitáz gén teljes hosszúságú kódoló szekvenciáját tartal-

mazza, részlegesen emésztjük XhoI enzimmal, és teljesen megemésztjük PstI restriktációs enzimmal. Az XhoI/PstI fragmentet, amely a 6-os aminosavtól kezdődően tartalmazza az érett fitázt kódoló DNS szekvenciát, a pMOG426 vektorba klónozzuk, amelyet XhoI és PstI restriktációs enzimmal emésztettünk. A keletkező pMOG428 vektorból a teljes, a kiméra fitáz gént tartalmazó konstrukciót egy EcoRI/HindIII fragment formájában beépítjük a pMOG23 bináris vektorba, amelyet EcoRI és HindIII restriktációs enzimekkel linearizáltunk. A kapott, pMOG429 bináris vektort (5. ábra), az Escherichia coli K-12 RK2013 törzzsel (amely a pRK2013 plazmidot tartalmazza) (Ditta et al., supra) egy háromszülős keresztezés során mobilizáljuk, az Agrobacterium LBA4404 törzsbe (Hoekema et al., 1983, supra), amely egy olyan plazmidot hordoz, amely tartalmazza a T DNS növényekbe való átviteléhez szükséges virulencia géneket.

8. példa:

A fitáz stabil magspecifikus expressziója dohánymagvakban, a kruciferin promoter szabályozása alatt

Az Agrobacterium LBA4404 törzset, amely a pMOG429 bináris vektort tartalmazza, benne a fitáz cDNS a kruciferin promoter szabályozása alatt, használjuk a transzformációs kísérletekben. A dohány (Nicotiana tabacum SR1) transzformálását úgy hajtjuk végre, hogy a levélkorongokat együtt tenyésztjük Horsch és munkatársai eljárása szerint (1985). A transzgenikus növényeket olyan hajtásokról szelektáljuk, amelyek szelekciós táptalajon nőnek (100 mg/liter kanamicin). A fiatal növényekben vizsgáljuk az NPTII aktivitást (kanamicin rezisztencia), teljes érettségig felneveljük, hagyjuk, hogy önmagukat beporozzák, majd termeljenek magvakat. Az egyes transzformánsokból származó magvakat egyesítjük, majd a magminta egy részében megvizsgáljuk a fitáz aktivitását. Azokból a klónokból, amelyek a legmagasabb expressziós szintet mutatják a transzformálatlan kontroll magvakhoz viszonyítva, a megmaradó magvakat kanamicinen (200 mg/liter) csíráztatjuk. A kapott S2 magvakból kapott adatok alapján az NPTII-re homozigóta (és így a fitázra is homozigóta) magvakat szelektáljuk, és azoknak a növényeknek a nagymennyiségben való előállítására használjuk, amelyek a legnagyobb mennyiségben képesek a fitáz előállítására a magvaikban. Ezeket lehet azután használni, például az emésztési kísérletekben.

A transzgenikus magvakban talált fitázaktivitás meghatározásához körülbelül 50 mg magot veszünk, és egy jéghideg dörzscsészében eldörzsöljük 1 ml 25 mM nátrium-acetát pufferrel (pH=5,5). A centrifugálás után a felülúszót a tranziens vizsgálatnál leírt módon vizsgáljuk. 55 függetlenül transzformált dohánynövényben az összes oldható magfehérjére vonatkoztatva 0,15%-os maximális fitázexpressziós szintet figyeltünk meg. A fitázaktivitás nem volt kimutatható a transzgenikus növények szárában, gyökereiben és ágaiban. Fitázaktivitás nem mutatható ki a transzformálatlan növényekben sem.

9. példa:

Repece transzformálása

Ebben a példában a repce olyan transzformálását írjuk le, melynek során a növényi szövetet együtt tenyésztjük a kiméra fitáz gént hordozó bináris vektort tartalmazó Agrobacterium tumefacienssel. A transzgenikus növényeket az antibiotikum rezisztencia alapján lehet szelektálni. A transzgenikus növényekben vizsgálhatjuk a fitáz aktivitását. A magas szinten expresszálókat alaposabban vizsgáljuk, és a további kísérletekben alkalmazzuk.

Ugyanazt a bináris vektorban levő kiméra fitáz konstrukciót (pMOG429) mobilizáljuk Agrobacterium tumefaciens LBA4404 törzsbe, ahhoz hasonló módon, mint amit a 7. példában leírtunk. Ezt a törzset használhatjuk repce (Brassica napus cv. Westar) transzformálására. Ebből a célból 5–6 hetes, éppen virágzás előtt álló növényekből vett, felületen sterilizált szárdarabokat veszünk, 24 óra hosszát előkondicionáljuk MS táptalajban [Fry et al., Plant Cell Reports, 6, 321 (1987)] 1 mg/liter BAP-pal, majd 48 óra hosszát együtt tenyésztjük Agrobacteriummal, ugyanazt a táptalajt tartalmazó friss lemezekben. A transzgenikus növénykezdemények azokról a hajtásokról regenerálhatók, amelyek nőnek szelekciós táptalajon (500 mg/liter karbenicillin, 40 mg/liter paromimicin), majd tovább elemezzük a 8. példában dohányra leírt módon.

10. példa:

A fitázaktivitás vizsgálata

Olyan mennyiségű transzgenikus növényből származó anyagot öröklünk meg, amelyben összesen körülbelül 0,25 PTU van. (PTU = fitáz egység. Egy egység fitázaktivitást úgy definiálunk, mint azt az enzimmennyiséget, amely 1,5 mM nátrium-fitátból 1 µmol/perc sebességgel (37 °C, pH=2,5) szabadít fel szervesen foszfátot.

A megőrölt növényi anyagot 50 ml össztérfogatú 250 mM glicin/HCl pufferben (pH=2,5) inkubáljuk, amely 0,86 g nátrium-fitát × 11 H₂O-t tartalmaz. Jóllehet az Aspergillus fitáz mind 2,5-ös, mind 5,5-ös pH optimum mellett expresszál, az alacsonyabb pH-t választjuk, hogy a növény fitázaktivitását kizárjuk.

A kapott elegyet 15, illetve 60 percig inkubáljuk 37 °C-on. A reakciót úgy állítjuk le, hogy az inkubált reakcióelegyből 5 ml-t teszünk 5 ml 10%-os TCA-ba (triklór-ecetsav). Ezután 10 ml indikátor reagenst [3,66 g vas(II)-szulfát-7 víz, 50 ml ammónium-molibdát oldatban (2,5 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ × 4H₂O és 8 ml koncentrált kénsav, 250 ml-re hígítva desztillált vízzel)] adunk a leállított enzimoldathoz. A kék szín intenzitását spektrofotometriásan mérjük 700 nm-en.

A T=0 időpontban mért szervesen foszfáttartalom szolgál kontrollként.

A mérések a felszabadított foszfát mennyiségét jelzik, a 0–1 mM koncentráció-tartományban levő foszfát kalibrációs görbe alapján.

11. példa:

A megőrölt Nicotiana tabacum növényi anyag inkubálása táppal

Egy tipikus kísérletben 0,25 g oldószerrel extrahált szójalisztet inkubálunk 25 mg őrölt Nicotiana tabacum növényi anyaggal, amely körülbelül 0,25 PTU-t tartalmaz a fentiek szerint, azzal az eltéréssel, hogy nátriumfitátot adunk hozzá. Ebben az esetben a hozzáadott inkubáló anyag 410 ml puffer és 90 ml víz elegye.

A foszfát felszabadulását fitátból oldószerrel extrahált szójalisztben, a 6. ábrán mutatjuk be. Hozzáadott őrölt mag nélkül nincs megfigyelhető aktivitás.

Egy látszólag azonos kísérletben hasonló eredményeket kapunk kukorica glutén táppal is, mint szubsztátummal. Az eredményeket a 6. ábrán mutatjuk be.

Nincs megfigyelhető aktivitás az őrölt növényi anyag távollétében, illetve akkor, ha a hozzáadott növényi anyag nem tartalmaz fitázaktivitást.

12. példa:

A fitázt tartalmazó transzgenikus növényi anyag in vitro vizsgálata olyan körülmények között, amelyek a szárnyasok emésztőrendszerét szimulálják

Hogy felbecsüljük transzgenikus dohánynövényben termelt fitáz hatékonyságát, az Aspergillusból származó fitáz aktivitását olyan modellben határozzuk meg, amely a szárnyasok emésztőrendszerében található körülményeket utánozza.

Egy standard szárnyastáp mintát először 1 g/15 ml víz koncentrációban inkubálunk 60 percig 39 °C-on, hogy ezzel szimuláljuk az állatokban előforduló körülményeket a terményben. Ezt követően 5 ml pepszindatot (Merck: 5,28 g/l, pH=3,0, sósavval beállítva) adunk hozzá, a pH értéket sósavval pH=3,0-ra állítva, majd az inkubálást további 90 percig folytatjuk ugyanazon a hőmérsékleten, hogy a gyomorban előforduló körülményeket szimuláljuk.

Az inkubációs periódus során mintákat veszünk, hogy meghatározzuk a tápban levő fitátból felszabadult foszfát mennyiségét.

A gomba fitázhatása nyilvánvaló a 10. ábrából. A fitáz dózist 250 PTU/kg tápról 1000 PTU/kg tápra növelve, a tápmintából megnövekedett mennyiségű foszfát szabadul fel.

Ha egy transzgenikus dohánynövényi anyagot, akár magvakat, akár leveleket (413.25 vagy 413.32 vonalak, dörzscsészében megőrölve) alkalmazunk a gomba fitáz helyett, hasonló mértékben foszfát felszabadulást figyelhetünk meg (11. ábra). Kontroll dohánynövényt is vizsgáltunk, amely nem tartalmaz fitázt. A vak kontrollal összehasonlítva nem volt foszfátfelhalmozás megfigyelhető.

Az 50 g transzgenikus dohánymag/kg táppal kapott eredményeket összehasonlítva azokkal, amelyeket az 500–750 PTU/kg táppal kaptunk, azt az eredményt kapjuk, hogy 1 g dohánymag körülbelül 12 PTU-nak felel meg ebben az in vitro szárnyas emésztési modellben. Levelekből származó anyag vizsgálatával az derült ki, hogy 1 g (nedves súly) dohánylevél körülbelül 25 PTU-t tartalmaz.

13. példa:

Vizsgálatok állatokban

A vizsgálatokat broilerekkel végezzük, hogy igazoljuk a növényi magvakban expresszáldott fitáz hatékonyságát, valamint bármely, a dohánymagvakból származó negatív hatás hiányát a zootechnikai eredményekre.

A fitázt expresszáld dohánymagvakat és kontroll magvakat begyűjtjük. A magvakat 100 grammos részletekben megőröljük, és egy olyan szitát alkalmazunk (Retch–mill ZM1), amelynek a pórusmérete 500 µm, és vigyázunk arra, hogy a magvakat hűtve tartsuk.

Egynapos broiler kakasokat (Hybro) tartunk kétállatos ketrecekben (0,45 m²). Az első két napban a szoba-hőmérséklet 32 °C, majd az első héten 4 °C-kal csökkentjük. Minden ezt követő héten a hőmérsékletet 2 °C-kal csökkentjük. A broilereket egy óra megvilágítás és három óra sötétséget váltogatva tenyészítjük.

Az állatokat New Castle betegséggel szemben egy-napos korukban vakcináljuk, Clone 30 vakcina alkalmazásával. A kísérletek során a broilereket a kísérleti táppal etetjük, tetszés szerinti mennyiségben. A növekedési és a táp/súlynövekedés arányt a kísérleti időszakban mérjük. Az összes foszfor látszólagos hozzáférhetőségét háromnapos periódusokban mérjük, amely során a tápfogyasztást szárazanyag felvétellel mérjük, az ürüléket pedig teljes egészében összegyűjtjük.

A foszfor látszólagos hozzáférhetőségét úgy határozzuk meg, mint azt a különbséget, ami a felvett foszfor és a kiürített foszfor mennyiséget között van.

Az alábbi, fitáz hozzáadása nélküli kontroll étrendet alkalmazzuk:

Étrendek	Ca (%)	Össz-foszfor (%)	fitát-foszfor (%)
1	0,60	0,45	0,30
2	0,75	0,60	0,30
3	0,90	0,75	0,30

Foszfátot nem adunk az 1-es étrendhez (alap étrend). Kalciumot és foszfort vízmentes dikalcium-foszfát és monoammónium-foszfát 5:1 arányú elegyével viszünk be a 2-es és 3-as étrendekbe. Az összes kísérleti étrendet az alapétrend kiegészítésével állítjuk elő (1. táblázat).

A 4-es kísérleti étrend tartalmaz mikrobiális eredetű fitázt 400 PTU/kg táp mennyiségben, Van Gorcom és munkatársai által leírt módon előállítva (1991).

Az 5-ös kísérleti étrend hasonlít a 4-eshez, de őrölt nem-transzgenikus dohánymagvakat adunk a tápkeverékhez, ezzel a 3 kg/90 kg táp végső arányt állítva be.

A 6-os kísérleti étrend is hasonló a 4-eshez, de 3 kg transzgenikus dohányból származó (413.25 vonal) őrölt magot adunk 90 kg táphoz, így kapjuk a 400 PTU/kg táp végkoncentrációt.

A kísérletet 176 broilerrel végezzük 16 ketrec-csoportban (11 per ketreccsoport) 24 napos korig. A kezeléseket (étrendek) kétszer megismételjük, és az egyes sorokban levő ketrecekhez véletlenszerűen rendeljük hozzá.

A foszfor felhasználhatóságát 21–24 napos kortól mérjük.

A foszfor felhasználhatóságát és a 4-es, 5-ös és 6-os étrenden tartott állatok növekedése a fitáz hozzáadásának pozitív hatását mutatja (2. táblázat). A 4-es, 5-ös és 6-os étrendek összehasonlítása azt mutatja, hogy a dohánymagvak belekeverése az étrendbe összefér a mikrobiális fitáz működésével haszonállatok, például broilerek emésztési rendszerében, és nem mutat negatív hatást a zootechnikai eredményekre.

Jóllehet a találmányt specifikus megvalósítási módjaira való hivatkozásokkal írtuk le, a szakterületen jártas szakemberek számára világos, hogy különböző változtatások hajthatók végre, és az egymással egyenértékű dolgok helyettesíthetők egymással anélkül, hogy eltérnének a jelen találmány oltalmi körétől és szellemétől.

Emellett számos módosítás hajtható végre, hogy egy adott helyzethez, anyaghoz, növényhez, maghoz, eljáráshoz, vagy a találmány tárgyának, szellemének és oltalmi körének eljárási lépéséhez vagy lépéseihez alkalmazkodjunk. Az összes ilyen módosítás a megadott igénypontok oltalmi körébe tartoznak.

1. táblázat

Broilerekkel végzett kísérletek alapétrendjének összetétele

Adalékanyagok	Mennyiség (g/k)
Sárga kukorica	28,0
Círok (alacsony tannintartalom)	200,0

	Adalékanyagok	Mennyiség (g/k)
5	Napraforgóliszt (oldószerrel extr.)	80,0
	Szójaliszt (oldószerrel extr., 48% fehérje)	350,0
	Szójaolaj	58,5
	Vitaminok*	5,0
10	Ásványi anyagok*	15,0
	Mészkő	1,0
	Szintetikus metionin	1,0
	Cr ₂ O ₃	0,5
15		1001,0
	ME (MJ/kg)	13,1
	Lizin	12,9
	Metionin+cisztein	9,1
20	Kalcium	6,0 (6,0–6,6)**
	Össz-foszfor	4,5 (4,7–4,7)**
	Szerves fitikus foszfor	3,0 (3,1–3,1)**

25 * Az egy kg táppal bevitt mennyiség: 12 000 IU A vitamin; 2000 IU D₃ vitamin; 5 IU E vitamin; 1,5 mg K₃ vitamin; 1 mg tiamin; 5 mg riboflavin; 1 mg piridoxin; 30 mg nikotinsav; 7,5 mg D-pantoténsav; 0,015 mg B₁₂ vitamin; 0,5 mg folsav; 350 mg kolin-klorid; 75 mg etoxiquin; 9,5 g CaCO₃; 2,5 g NaCl; 0,25 g FeSO₄; 0,24 g MnSO₄; 45 mg CuSO₄; 60 mg ZnSO₄; 105 mg KI elegy.

30 ** () Az 1-es, illetve 2-es kísérletekhez elemezve.

2. táblázat

A fitáz hatása az össz foszfát és kalcium látszólagos felhasználhatóságára, a P tartalom a trágyában és a broilerek teljesítménye

Étrendek	Ca/P (g/kg)	Hozzáadott fitáz (U/kg)	Felhasználhatóság (%) 21–24. nap		A P mennyisége a trágyában (g) per kg táp felv.	Növ. 0–24 (g)
			P	Ca		
1	6/4,5	0	49,8	47,2	2,7	338
2	7/5,6	0	45,6	48,9	3,8	592
3	9/7,5	0	44,6	46,9	4,9	683
4	mint az 1.	400	60,5	58,6	2,1	620
5	mint az 1.	0	48,5	48,0	2,7	340
6	mint az 1.	400	60,2	59,3	2,1	615

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás megnövelt mennyiségű fitázt tartalmazó transzgenikus növények vagy növényi szövetek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy növényi gazdaszervezetet olyan expressziós konstrukcióval transzformálunk, amely egy fitázt kódoló, mikrobiális forrásból származó DNS-szekvenciát tartalmaz a fitáz növényi gazdaszervezetben való expresszióját vezérlő szabá-

lyozó szekvenciákhoz működőképesen kapcsolva, és a transzformált növényt a fitázt kódoló DNS-szekvencia expresszióját biztosító körülmények között növesztjük.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az expressziós konstrukció a fitáz konstitutív expresszióját irányító szabályozó szekvenciát tartalmaz. Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az expressziós konstrukció a fitáz szövet-specifikus expresszióját vezérli.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fitázt kódoló DNS-szekvencia egy fonalgombából származik.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fitázt kódoló DNS-szekvencia egy *Aspergillus*-ból származik.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a fitázt kódoló DNS-szekvencia egy *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* vagy egy *Aspergillus nidulans* fajtából származik.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

7. Eljárás expressziós konstrukció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy mikrobiális fitázt kódoló DNS-szekvenciát működőképesen összekapcsolunk egy növényi gazdaszervezetben a fitáz konstitutív expresszióját biztosító szabályozó szekvenciával.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

8. Eljárás vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy alkalmas vektorba beépítünk egy 7. igénypont szerint előállított expressziós konstrukciót.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pMOG29 vektort állítjuk elő.

Elsőbbsége: 1990. 03. 23.

10. Eljárás baktériumtörzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy megfelelő baktériumtörzset egy 8. igénypont szerint előállított vektorral transzformálunk.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

11. Eljárás expressziós konstrukció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy mikrobiális fitázt kódoló DNS-szekvenciát működőképesen összekapcsolunk egy növényi gazdaszervezetben a fitáz szövetspecifikus expresszióját biztosító szabályozó szekvenciával.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

12. Eljárás vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy alkalmas vektorba beépítünk egy 11. igénypont szerint előállított expressziós konstrukciót.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

13. Eljárás egy baktériumtörzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy megfelelő baktériumtörzset egy 12. igénypont szerint előállított vektorral transzformálunk.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

14. Eljárás transzgenikus növény vagy növényi szerv előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy növény vagy növényi szerv genomjába bejuttatunk egy 7. vagy 11. igénypont szerint előállított expressziós konstrukciót.

5 Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

15. Eljárás fitáz kinyerésére egy növényből vagy növényi szervből, *azzal jellemezve*, hogy a fitázt szokásos eljárással az 1–6. vagy 14. igénypontok bármelyike szerint előállított transzgenikus növényből vagy növényi szervből nyerjük ki.

10 Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

16. Eljárás fitáz átalakítására inozittá és szervetlen foszfáttá, *azzal jellemezve*, hogy egy 15. igénypont szerint előállított fitáz enzimet fitátot tartalmazó szubsztrátra alkalmazunk.

15 Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

17. Eljárás állati tápkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy szokásos állati tápot egy 15. igénypont szerint előállított fitázzal összekeverünk.

20 Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

18. Eljárás állati tápkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy szokásosan alkalmazott állati tápot egy, az 1–6. igénypontok bármelyike szerint előállított fitáz-tartalmú transzgenikus növényvel vagy növényi szervvel összekeverünk.

25 Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

19. Eljárás állatok növekedésének elősegítésére, *azzal jellemezve*, hogy az állatokat egy 17. vagy 18. igénypont szerint előállított hatékony mennyiségű tápkészítménnyel etetjük.

30 Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

20. Eljárás állati trágyában a fitát szintjének csökkentésére, *azzal jellemezve*, hogy az állatokat egy 17. vagy 18. igénypont szerint előállított, a tápban lévő fitátot inozittá és szervetlen foszfáttá átalakító, hatékony mennyiségű tápkészítménnyel etetjük.

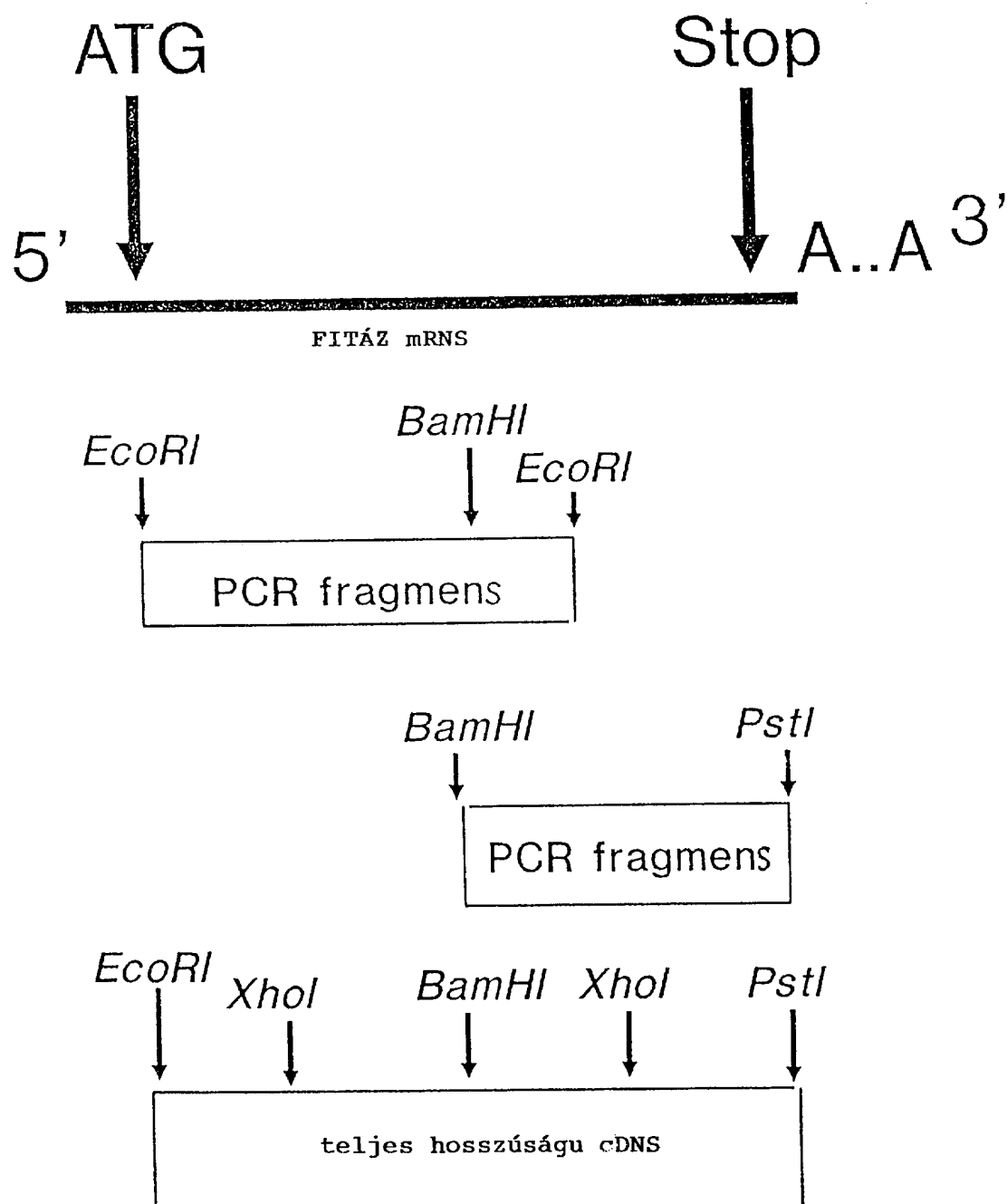
35 Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

21. Eljárás fitáz előállítására, *azzal jellemezve*, hogy (i) egy növényi gazdaszervezetet olyan expressziós konstrukcióval transzformálunk, amely egy mikrobiális eredetű fitázt kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz – a növényi gazdaszervezetben megnövelt mennyiségű fitáz expresszióját vezérlő – szabályozó szekvenciákhoz működőképesen kapcsolva, majd a transzformált növényt a fitázt kódoló DNS-szekvencia expresszióját a növényi szövetben biztosító körülmények között növesztjük; és

40 (ii) a transzgenikus növényi szövetből a fitázt kinyerjük.

Elsőbbsége: 1990. 09. 21.

1. Á B R A



2. Á B R A (2/1 lap)

1 ATGGGCGTCTCTGCTGTTCTACTTCCTTTGTATCTCCTGTCTGGAGTCACCTCCGGACTG
-23 M G V S A V L L P L Y L L S G V T S G L

61 GCAGTCCCCGCCTCGAGAAATCAATCCAGTTGCGATACGGTCGATCAGGGGTATCAATGC
A V P A S R N Q S S C D T V D Q G Y Q C
-1 +1

121 TTCTCCGAGACTTCGCATCTTTGGGGTCAATACGCACCGTTCCTCTCTCTGGCAAACGAA
18 F S E T S H L W G Q Y A P F F S L A N E

181 TCGGTCATCTCCCTGAGGTGCCCCGCCGATGCAGAGTCACCTTCGCTCAGGTCCTCTCC
38 S V I S P E V P A G C R V T F A Q V L S

241 CGTCATGGAGCGCGGTATCCGACCGACTCCAAGGGCAAGAAATACTCCGCTCTCATTGAG
58 R H G A R Y P T D S K G K K Y S A L I E

301 GAGATCCAGCAGAACGCGACCACCTTTGACGGAAAATATGCCTTCCTGAAGACATACAAC
78 E I Q Q N A T T F D G K Y A F L K T Y N

361 TACAGCTTGGGTGCAGATGACCTGACTCCCTTCGGAGAACAGGAGCTAGTCAACTCCGGC
98 Y S L G A D D L T P F G E Q E L V N S G

421 ATCAAGTTCTACCAGCGGTACGAATCGCTCACAAGGAACATCGTTCCATTTCATCCGATCC
118 I K F Y Q R Y E S L T R N I V P F I R S

481 TCTGGCTCCAGCCGCGTGATCGCTCCGGCAAGAAATTCATCGAGGGCTTCAGAGCACC
138 S G S S R V I A S G K K F I E G F Q S T

541 AAGCTGAAGGATCCTCGTGCCCGAGCCCGCCAATCGTCGCCCAAGATCGACGTGGTCATT
158 K L K D P R A Q P G Q S S P K I D V V I

601 TCCGAGGCCAGCTCATCCAACAACACTCTCGACCCAGGCACCTGCACTGTCTTCAAGAC
178 S E A S S S N N T L D P G T C T V F E D

661 AGCGAATTGGCCGATACCGTCGAAGCCAATTTACCGCCACGTTCTGTCCTCCCTCCATTCTG
198 S E L A D T V E A N F T A T F V P S I R

721 CAACGTCTGGAGAACGACCTGTCCGGTGTGACTCTCACAGACACAGAAGTGACCTACCTC
218 Q R L E N D L S G V T L T D T E V T Y L

781 ATGGACATGTGCTCCTTCGACACCATCTCCACCAGCACCGTCGACACCAAGCTGTCCCCC
238 M D M C S F D T I S T S T V D T K L S P

2. Á B R A (2/2 lap)

841 TTCTGTGACCTGTTACCCCATGACGAATGGATCAACTACGACTACCTCCAGTCCTTGAAA
258 F C D L F T H D E W I N Y D Y L Q S L K

901 AAGTATTACGGCCATGGTGCAGGTAACCCGCTCGGCCCGACCCAGGGCGTCGGCTACGCT
278 K Y Y G H G A G N P L G P T Q G V G Y A

961 AACGAGCTCATCGCCCGTCTGACCCACTCGCCTGTCCACGATGACACCAGTTCCAACCAC
298 N E L I A R L T H S P V H D D T S S N H

1021 ACTTTGGACTCGAGCCCGGCTACCTTTCCGCTCAACTCTACTCTCTACGCGGACTTTTCG
318 T L D S S P A T F P L N S T L Y A D F S

1081 CATGACAACGGCATCATCTCCATTCTCTTTGCTTTAGGTCTGTACAACGGCACTAAGCCG
338 H D N G I I S I L F A L G L Y N G T K P

1141 CTATCTACCACGACCGTGGAGAATATCACCCAGACAGATGGATTCTCGTCTGCTTGGACG
358 L S T T T V E N I T Q T D G F S S A W T

1201 GTTCCGTTTGCTTCGCGTTTGTACGTCGAGATGATGCAGTGTGAGGCGGAGCAGGAGCCG
378 V P F A S R L Y V E M M Q C Q A E Q E P

1261 CTGGTCCGTGTCTTGGTTAATGATCGCGTTGTCCCGCTGCATGGGTGTCCGGTTGATGCT
398 L V R V L V N D R V V P L H G C P V D A

1321 TTGGGGAGATGTACCCGGGATAGCTTTGTGAGGGGGTTGAGCTTTGCTAGATCTGGGGGT
418 L G R C T R D S F V R G L S F A R S G G

1381 GATTGGGCGGAGTGTTTTGCTTAG
438 D W A E C F A *

3. Á B R A



Polilinker szekvencia

Eco RI	Kpn I	Sma I	Bam HI	Xba I	Xha I	Hind III
5' <u>GGAATTCTG</u> <u>TACCTCCCGGAGGATCCATCTAGAGCTCGAGTAAGCTTC</u> 3'						
						Sac I

4. Á B R A (2/1 lap)

Oligonukleotid duplex A

	<u>NcoI</u>	<u>BamHI</u>	<u>HindIII</u>
5'GGGTTTAAATTTCTTTCAAAATACTTCCACCATGGGTAACGGATCCA			3'
3'CCCAAAATAAAATTAAGAAAGTTTATGAAGGTGGTACCCATTGCCCTAGGTTCCA			5'

Oligonukleotid duplex B

	<u>SphI</u>	<u>XhoI</u>	<u>BamHI</u>
5'CATGAAACTTCCTCAAAGCTTCCCTTTTATGCCCTTCTTGTGTTGGCCCAATACTTTGTAGCTGTACGCAATGCTCGAG			3'
3' TTTGAAGGAGTTTTCGAAGGGGAAAAATACGGAAGGAAACAAAACCGGTTATGAAACATCGACAATGCGTACGAGCTCCTAG			5'

Oligonukleotid duplex C

<u>SphI</u>	<u>XhoI</u>	<u>PstI</u>	<u>BamHI</u>
5' CT	CTGGCAGTCCCGCCCTCGAGCCCCCTGCAG		3'
3' GTACGA	GACCGTCAGGGCGGAGCTCGGGGACGTCCTAG		5'
PROB12	Érett fitáz		
szignál			
peptid			

4. Á B R A (2/2 lap)

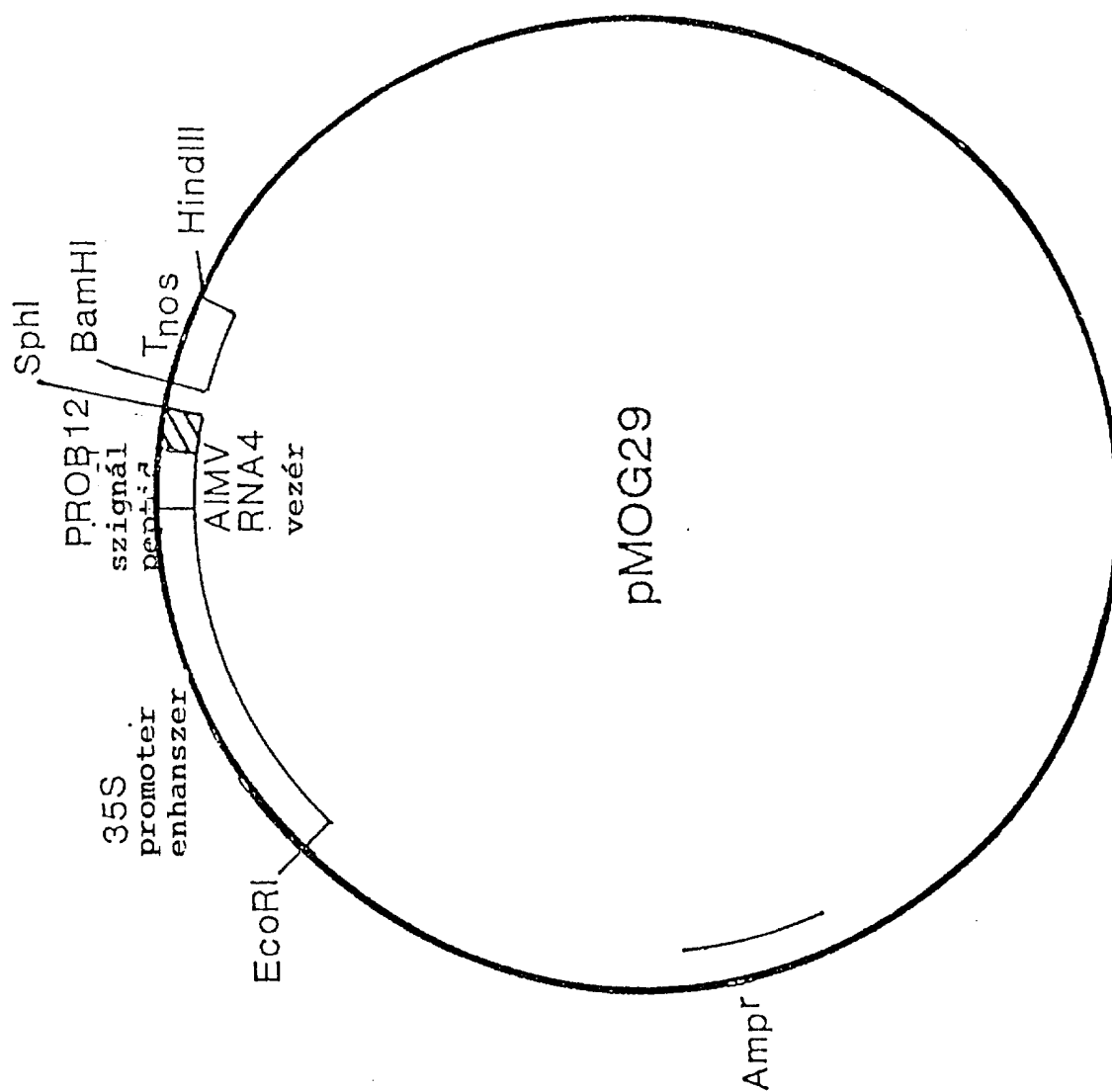
Oligonukleotid duplex D

<u>NcoI</u>	<u>XhoI</u>	<u>EcoRV</u>	<u>PstI</u>	<u>BglII</u>	<u>HindIII</u>
HisGlySerThrAla					
5' CATGGCTCTACAGCT	LeuAlaValProAlaSer				3'
3' CGAGATGTCGA	CTGGCAGTCCCCCGCTCGAGGATATCCTGCAGATCTCCCCA				5'
CruA szignál	GACCGTCAGGGCGGAGCTCCTATAGGACGTCTAGAGGGGTTCCA				
peptid	Érett fitáz				
	Többszörös klónozási hely				

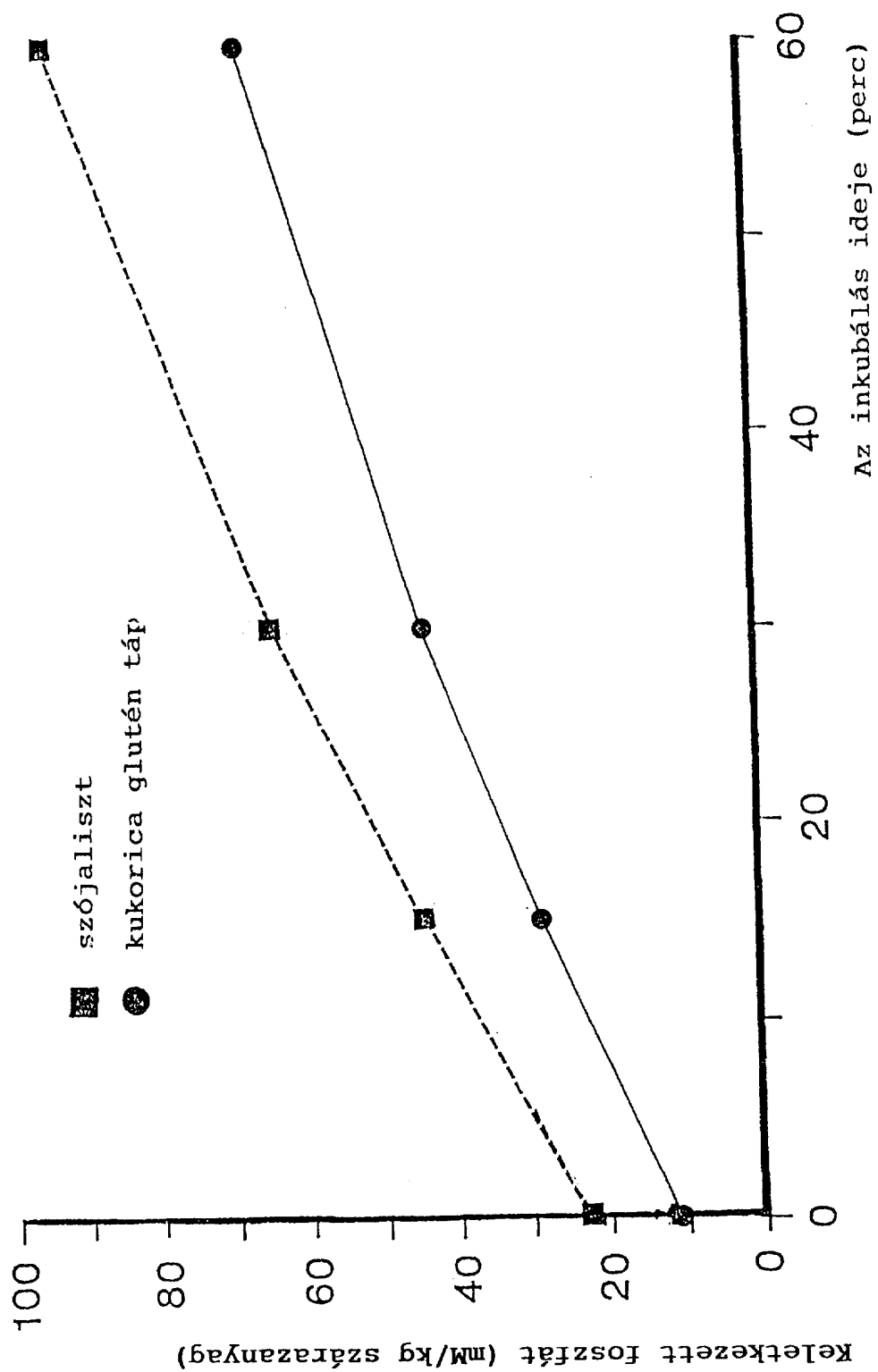
Oligonukleotid duplex E

5' AATTCAGATCTCCATGATCGATGAGCT	3'
3' GTCTAGAGGTACCTAGCTAC	5'

5. Á B R A



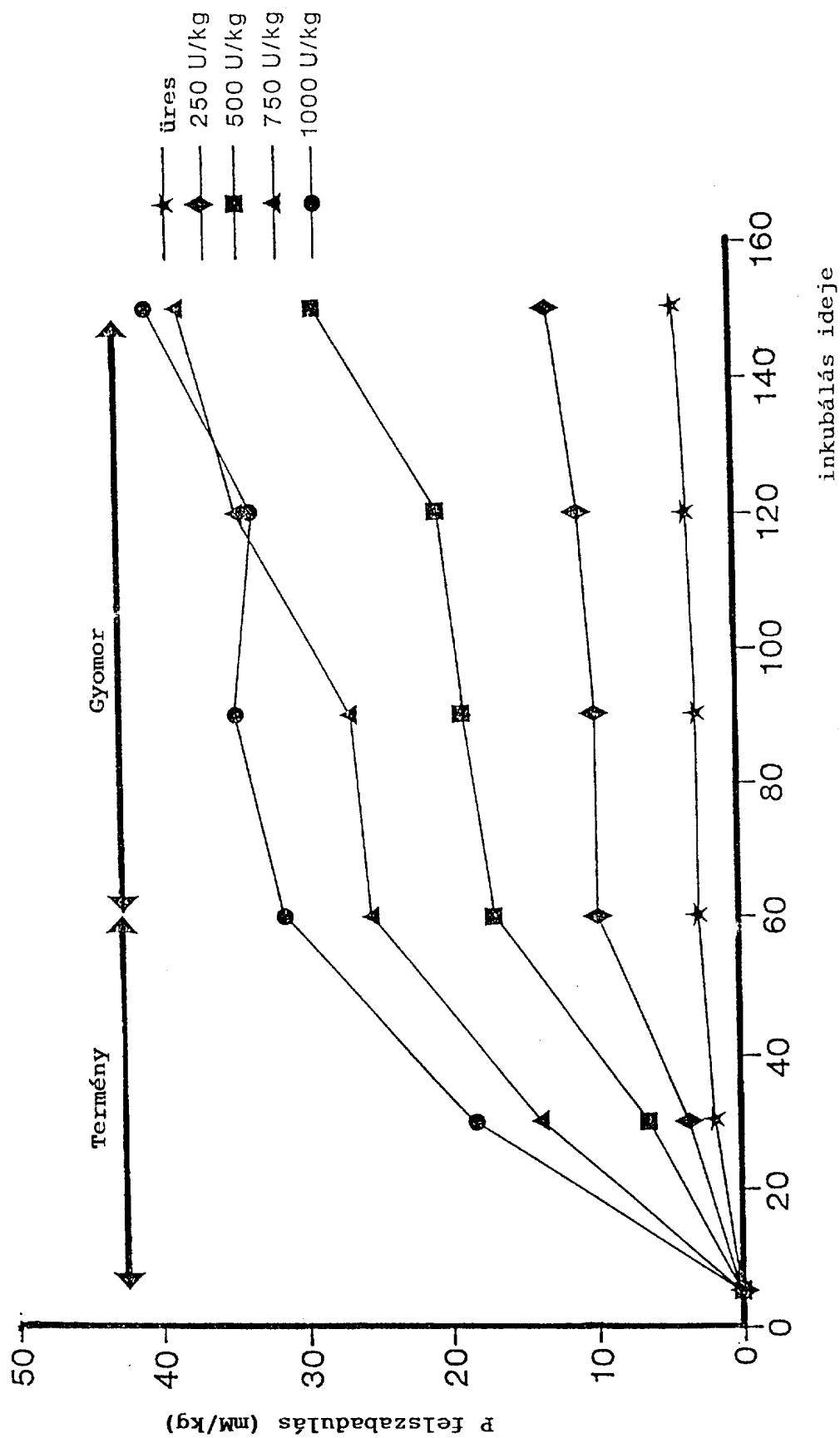
6. Á B R A



7. Á B R A

IN VITRO EMÉSZTÉSI MODELL

Aspergillus fitáz dózis-hatás kapcsolat



IN VITRO EMÉSZTHETŐSÉGI MODELL

Aspergillus és dohánymag fitáz

