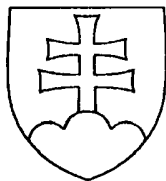


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

763-95

(22) Dátum podania: 10.12.93

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9225845.8

(32) Dátum priority: 10.12.92

(33) Krajina priority: GB

(43) Dátum zverejnenia: ~~09.08.1995~~ 13. sept. 1995

(86) Číslo PCT: PCT/GB93/02528, 10.12.93

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/54,
C 12 N 15/82,
15/11,
9/10,
A 01 H 5/00,
C 11 B 1/00

(71) Prihlasovateľ: Nickerson Biocem Limited, Milton Road, Cambridge, GB;

(72) Pôvodca vynálezu: Slabas Antoni Ryszard, Durham, GB;
Brown Adrian Paul, Durham, GB;

(54) Názov prihlášky vynálezu: DNA kódujúca 2-acyltransferázy

(57) Anotácia:
Rastliny, hlavne transgénne, majúce 2-acyltransferázový enzým alebo iný nerozpustný acyltransferázový enzým so zmenenou substrátovou špecifitou v porovnaní s prirodzeným enzýmom, môžu byť pripravené. Napríklad olejnatosemenná repka (*Brassica napus*) môže obsahovať 2-acyltransferázový transgén odvodený od *Limnathes douglassi* za účelom zvýšenia obsahu kyseliny erukovej v oleji. cDNA sekvencia kukuričnej (*Zea mays*) 2-acyltransferázy je opísaná a je použiteľná na klonovanie acyltransferázových génov a/alebo cDNA z iných organizmov včítane *L. douglassi*.

DNA KÓDUJÚCA 2-ACYLTRANSFERÁZY

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka modifikovaných rastlín. Hlavne sa vynález týka rastlín modifikovaných tak, že aspoň časť rastliny (napríklad semená rastliny) je schopná poskytnúť komerčne využiteľný olej.

Doterajší stav techniky

Rastliny sú už dlhú dobu komerčne cenným zdrojom oleja. Nutričné využitie olejov získaných z rastlín bolo doteraz dominantné, ale pozornosť sa teraz obracia k rastlinám ako zdroju priemyselne využiteľných olejov, napríklad ako náhrad alebo zlepšenie minerálnych olejov. Olejové semená, ako z repky, obsahujú rôzne lipidy (Hildish a Williams, "Chemical Composition of Natural Lipids", Chapman Hall, Londýn, 1964). Teraz je prejavovaný záujem o zmenu lipidového zloženia za použitia rekombinantnej DNA technológie (Knauf, TIBtech, február 1987, 40 - 47), ale doteraz neboli realizované žiadne z týchto cieľov, a to z veľa rôznych príčin navzdory stále sa zvyšujúcej náročnosti technológie.

Úspech v zmene obsahu lipidov v olejoch získaných z rastlín vyžaduje spoľahlivú znalosť biochémie a génov, ktoré sú tu obsiahnuté. V širšom zmysle sú dostupné dve riešenia. Po prvé, môžu byť rastliny modifikované tak, aby umožnili syntézu mastných kyselín, ktoré sú nové (pre rastlinu); tak môžu byť napríklad laurát a/alebo stearát syntetizované v repke. Po druhé, spôsob a/alebo prebytok inkorporácie mastných kyselín do glycerolového reťazca lipidu môže byť zmenený. Druhé riešenie je obsiahnuté v predloženom vynáleze, i keď prvé môže byť navyiac tiež využité.

Lipidy sú vytvárané v rastlinách adíciou skupín mastnej kyseliny na glycerolový reťazec sériou acyltransferázových

enzýmov. V glycerolovej molekule sú tri polohy, do ktorých môžu byť skupiny mastnej kyseliny (acyl) substituované a substitúcia dosahovaná v každej polohe je katalyzovaná polohovo špecifickým enzýmom: tento enzým je známy ako 1-, 2- a 3-acyltransferáza.

Jedným, ale nie iba týmto, súčasným cieľom "lipidového inžinierstva" v rastlinách je poskytnutie olejov, obsahujúcich lipidy s vysokým obsahom erukovej (22 : 1) kyseliny. Erukovú kyselinu obsahujúce lipidy sú komerčne žiaduce z veľa dôvodov, hlavne ako náhrady alebo doplnky minerálnych olejov za určitých podmienok, ako bolo uvedené vyššie. V prípade oleja zo semien repky (*Brassica napus*), v súčasnosti jednej z najvýznamnejších olej produkujúcich plodín, špecifita enzýmu 2-acyltransferáza pozitívne rozpoznáva inkorporáciu erukovej kyseliny v polohe 2. Tak i keď sú tieto kultivary repky schopné inkorporovať kyselinu erukovú v polohách 1 a 3, nie je tu žiadna (alebo je aspoň redukovaná) diskriminácia voči erukovej kyseline, iba maximálne 66 % mastných kyselín inkorporovaných do triacylglycerolov môže byť kyselina eruková. Takéto odrody repky sú známe ako HEAR (high erucic acid rape - repka s vysokým obsahom kyseliny erukovej).

Bolo by žiaduce zvýšiť obsah kyseliny erukovej v bežných repkových olejnatých semenách, ako i HEAR odrodách; to isté je možné uviesť u rastlín, ktoré sú zdrojom rastlinných olejov ako je kukurica, slnečnica a sója, čo predstavuje len niekoľko príkladov takýchto rastlín. I keď v zásade je možné zaviesť do požadovanej rastliny DNA, kódujúca 2-acyltransferázu špecifickú pre odlišnú masťnú kyselinu, napríklad z odlišnej rastliny, v praxi tu existuje rad problémov.

Po prvé, sú 2-acyltransferáza a 3-acyltransferáza membránovo viazané, a preto nerozpustné enzýmy. Neboli čistené. Toto robí prácu s nimi ťažkú a vylučuje použitie veľa bežných DNA klonovacích postupov. Táto ťažkosť paradoxne nezávisí od spôsobu klonovania génu (alebo aspoň cDNA) kódujúceho 1-acyltransferázový enzým, ktorý je rozpustný: v skutočnosti rekombinantná DNA práca vždy podlieha tomuto enzýmu z celkom

rozdielnych dôvodov, menovite zvýšenia odolnosti voči chladu v listoch tabakových rastlín - Murata a spol. (Nature 356, 710 - 713, 1992).

Po druhé, je veľmi málo známe o 2- a 3-acyltransferázach. Teraz nie je žiadna predstava o ich veľkosti alebo ako sú ciele k membránam. Nie sú dostupné žiadne údaje o nukleotidových alebo aminokyselinových sekvenciách a voči nim neboli zvýšené žiadne protilátky.

I keď tu bola diskusia o tom, že je žiaduce modifikovať 2-acyltransferázovú špecifitu, napríklad importovaním génu, kódujúceho zodpovedajúci enzým, ale odlišnej špecifity, z iných druhov, existuje tu v odbore potreba kľúčového riešenia, ktoré by umožnilo prácu vykonať. Predložený vynález poskytuje takéto kľúčové riešenie vo forme DNA sekvencie (v špecifickom prípade cDNA sekvencie) kódujúcej 2-acyltransferázu. DNA sekvencia na obr. 1 z nukleotidov 130 až 1254 kóduje 2-acyltransferázu z kukurice (*Zea mays*), obsahujúcej stop kodón.

Podstata vynálezu

Podľa prvého aspektu vynálezu je tu poskytnutá rekombinantná alebo izolovaná DNA sekvencia, výhodne kódujúca enzým, majúca membránovo naviazanú acyltransferázovú aktivitu a vybranú z:

- i) DNA sekvencie, zahrňujúcej DNA sekvenciu z obr. 1, kódujúcu aspoň od MET₄₄ do Stop₄₁₈ (SEQ ID: 2) alebo jej komplementárny reťazec,
- ii) nukleokyselinové sekvencie hybridizujúce k DNA sekvencii z obr. 1 (SEQ ID: 1) alebo jej komplementárnemu reťazcu za prísnych podmienok a
- iii) nukleokyselinové sekvencie, ktoré by mali hybridizovať k DNA sekvencii z obr. 1 (SEQ ID: 1), alebo jej komplementárnemu reťazcu, ale s degeneráciou genetického

kódu.

Fragmenty vyššie uvedených sekvencií, dĺžky napríklad aspoň 15, 20, 30, 40 alebo 60 nukleotidov, tiež spadajú do rozsahu vynálezu.

Vhodné prísne podmienky zahrňujú solné roztoky približne 0,9 molárne pri teplote od 35 °C do 65 °C. Konkrétnejšie, prísne hybridizačné podmienky zahrňujú 6 x SSC, 5 x Denhardtov roztok, 0,5 % pyrofosforečnan tetrasodný a 50 µg/ml denaturovanej DNA sledích spermií; premýva sa 2 x 30 minút pri 65 °C v 1 x SSC, 0,1 SDS a 1 x 30 minút v 0,2 x SSC, 0,1 % SDS pri 65 °C.

Sekvencie nukleovej kyseliny v rozsahu prvého aspektu vynálezu budú všeobecne kódovať proteín, majúci 2-acyltransferázovú aktivitu, ako je aktivita enzýmu kódovaného nukleokyselinovou sekvenciou na obr. 1. Nukleokyselinové sekvencie nekódujúce proteín, majúce enzymatickú aktivitu (alebo relevantnú enzymatickú aktivitu), ale inak v súlade s prvým aspektom vynálezu ako je uvedený vyššie, môžu byť použiteľné pre iné účely (a preto tiež sú zahrnuté v rozsahu vynálezu); napríklad môžu byť použiteľné ako sondy, ktorých použiteľnosť je daná nukleokyselinovými sekvenciami podľa prvého aspektu vynálezu, včítane samotnej sekvencie na obr. 1.

Využiteľnosť sondy vzniká nasledovne. Pretože tu je pravdepodobne vysoký stupeň homológie medzi acyltransferázami rôznych druhov (a hlavne medzi 2-acyltransferázami rôznych druhov) sekvencie na obr. 1 (alebo časti tejto sekvencie alebo inými sekvenciami v rozsahu vynálezu), môže byť použitá k sondovaniu cDNA alebo genomických knižníc iných druhov za účelom klonovania DNA sekvencií, kódujúcich acyltransferázy, majúce požadované špecifity. Napríklad, ak je žiaduce produkovať olej, majúci vysoký obsah erukovej kyseliny esterifikovanej ku glycerolu, môže byť sondovaná DNA knižnica akýchkoľvek druhov, ktoré prirodzene vytvárajú kyselinu erukovú. Vhodné rastliny zahrňujú (*Limnathes* spp., hlavne *L. alba* a hlavne *L. douglassi*)

a *Crambe*. *Limnathes douglassi* je preferovaný druh, pretože štúdie špecificity ukazujú, že je tu pozitívne rozlišovanie proti inkorporácii erukovej kyseliny do polohy 2 triacylglyceridu. Knižnice organizmov iných ako vyšších rastlín môžu byť sondované; napríklad určité baktérie môžu mať acyltransferázu požadovanej špecificity.

DNA podľa vynálezu bude všeobecne mať vyšší stupeň homológie s aspoň časťou sekvencie na obr. 1 ako so známymi sekvenciami.

Rekombinantná DNA podľa vynálezu môže mať formu vektoru, ktorý môže mať dostatočné regulačné sekvencie (ako je promótor) na riadenie expresie. Vektory, ktoré nie sú expresné vektory, sú vhodné pre klonovacie účely (ako môžu byť samotné expresné vektory). Hostiteľské bunky (ako sú baktérie a rastlinné bunky) obsahujúce vektory podľa vynálezu ako také tvoria súčasť vynálezu.

DNA sekvencie podľa vynálezu môžu byť použité pri ďalšom spôsobe klonovania génu z iných druhov: ak DNA je kopulovaná do vhodného promótoru, napríklad expresného vektoru vo vhodnom hostiteľskom organizme, môže byť produkovaný proteín. Takýto proteín môže byť použitý na prípravu polyklonálnych alebo monoklonálnych protilátok, alebo iných väzobných molekúl, ktoré potom môžu byť použité pre prehľadávanie pri expresii homológnych proteínov v iných druhoch, napríklad ako časť screeningového programu DNA knižnice.

Vhodné cDNA knižnice cieľových druhov budú všeobecne pripravené, ak je požadovaný gén pravdepodobne exprimovaný; cDNA embryovej knižnice (pripravené v skorom štádiu lipidovej syntézy) budú preferované - napríklad *Limnathes* spp.

Vynález tak umožňuje klonovanie širokého množstva génov (alebo všeobecnejšie DNA sekvencií) kódujúcich acyltransferázy a 2-acyltransferázy hlavne za použitia DNA sekvencií ako sú popísané vyššie.

Takéto acyltransferázy ako je z *Limnathes* spp. môžu byť tiež klonované priamo, napríklad s použitím komplementačných štúdií, z DNA knižnice požadovaných druhov. Napríklad ak je *E. coli* použitá ako komplementačný hosťiteľ, je zvolený mutant, ktorý je defektný v relevantnom enzýme (napríklad 2-acyltransferáze); DNA knižnica z cieľových druhov (ako je *L. douglassi*) sa klonuje do mutantného komplementačného hosťiteľa; hosťiteľské bunky inkorporujúce do svojho genómu gén cieľovej acyltransferázy, môžu byť ľahko oddelené za použitia vhodného selektívneho média. *E. coli* mutant JC201 je vhodný hosťiteľ na použitie v komplementačných štúdiách týkajúcich sa 2-acyltransferázy.

Klonovanie acyltransferázového génu, ktorý bol zvolený do mikrobiálneho hosťiteľa ako je baktéria podobná *E. coli* tak, že gén môže byť exprimovaný, má zvláštnu výhodu v tom, že substrátová špecificita acyltransferázového génu môže byť hodnotená v mikrobiálnom hosťiteľovi pred prípravou transformovaných rastlín, čím sa ušetrí čas na výskum. Takéto hodnotenie môže byť vykonané kompetitívnymi substrátovými skúškami, v ktorých rôzne detegovateľné značené substráty pre enzým vzájomne súťažajú o inkorporáciu do glyceridu. Napríklad ^{14}C -erucyl CoA a ^3H -oleoyl CoA môžu byť použité ako kompetitívne substráty pre 2-acyltransferázu a môžu byť merané relatívne množstvá ^{14}C alebo tritia prijatého do glyceridu. (Pretože 2-acyltransferázy majú akceptor, substráty na báze glycerolu a donor, substráty na báze mastných kyselín, môže byť pokus vykonaný s rôznymi akceptormi, ako je 1-erucyl-glycerol-3-fosfát a 1-oleoyl-glycerol-3-fosfát). Gén, kódujúci enzým, ktorý prednostne dodáva erukovú kyselinu k akceptoru (hlavne 1-erucyl-glycerol-3-fosfát) môže byť takto identifikovaný ako DNA sekvencia voľby pre ďalšie použitie vo vynáleze ako je popísané ďalej.

V druhom aspekte vynálezu je poskytnutá rastlina, majúca jeden alebo viac nerozpustných acyltransferázových enzýmov, majúcich substrátovú špecificitu, ktorá sa odlišuje od prirodzeného enzýmu rastliny.

I keď miestne riadená mutagenéza a/alebo iné techniky proteínového inžinierstva môžu byť použité na zmenenie špecificity enzýmu prirodzeného pre rastlinu, preferuje sa, že rastlina bude transgéna a bude inkorporovať expresibilný acyltransferázový gén, kódujúci enzým požadovanej špecificity z iných druhov. 2-acyltransferázy sú enzýmy voľby. Napríklad ako je popísané vyššie, 2-acyltransferázový enzým, ktorý má zvýšenú špecificitu pre, alebo aspoň nepôsobí proti erukovej kyseline, môže byť pripravený týmito prostriedkami na expresiu v rastline, ktorá by normálne neinkorporovala erukovú kyselinu do triacylglyceridov. Dôležité vyhotovenie vynálezu sa týka genetickým inžinierstvom spracovaných rastlín, ktoré majú vyššie hladiny erukovej kyseliny inkorporované do triacylglycerolov ako je to v nespracovaných rastlinách. I keď toto je výhodné vyhotovenie, nie je vynález obmedzený na zvýšenie inkorporácie kyseliny erukovej do glyceridov: podľa okolností môžu byť žiaduce i iné kyseliny.

K acyltransferázovému transgénu bol operatívne kopulovaný promótor, aby tento bol expresibilný. Pretože za súčasného stavu v odbore je ťažké presne regulovať miesto inkorporácie transgénu do hostiteľského genómu, je výhodné, aby transgén bol kopulovaný k svojmu promótoru pred transformáciou rastliny. Promótory vhodné podľa vynálezu môžu byť časovo a/alebo semenovo špecifické, ale nie je tu žiadna nevyhnutnosť, aby takéto boli: konštitutívne promótory ako je CaMV 35S promótor, môžu byť v skutočnosti preferované, pretože to sú zvyčajne silné promótory. Iné tkanivá sú nanešťastie nežiaducim spôsobom ovplyvnené, ak transgén, kódujúci acyltransferázový enzým je exprimovaný v nich, pretože využiteľnosť mastnej kyseliny CoA substrátov je účinne obmedzená na semeno.

Konštrukt promótor-transgén, ak je pripravený, sa zavedie do rastlinných buniek akýmkoľvek vhodnými prostriedkami. Vynález zahrňuje takéto rastlinné bunky. Výhodne je DNA transformovaná do rastlinných buniek za použitia bezramienkového Ti-plazmidového vektoru a nesená Agrobacteriom postupmi známymi v odbore, ako sú

napríklad popísané v EP-A-0116718 a EP-A-0270822. Alternatívne by mohla byť cudzia DNA zavedená priamo do rastlinných buniek za použitia zariadenia s elektrickým výbojom. Táto metóda je preferovaná ak je Agrobacterium neúčinné, napríklad tam, kde je rastlina, ktorá je príjemcom, jednodeložná. Vhodná môže tiež byť akákoľvek iná metóda, ktorá poskytuje stabilnú inkorporáciu DNA do jadrovej DNA akejkoľvek rastlinnej bunky akéhokoľvek druhu. Toto zahŕňa druhy rastlín, ktoré nie sú v súčasnosti schopné genetickej transformácie.

Výhodne obsahuje DNA podľa predloženého vynálezu tiež druhý chimerický gén ("marker" gén), ktorý umožňuje, aby transformovaná rastlina alebo tkanivová kultúra obsahujúca cudziu DNA boli ľahko odlišené od iných rastlín alebo tkanivových kultúr, ktoré neobsahujú cudziu DNA. Príklady takéhoto markerového génu zahrňujú antibiotickú rezistenciu (Herrera - Estrella a spol., EMBO J. 2(6), 987 - 995 (1983) a Herrera - Estrella a spol., Nature 303, 209 - 213 (1983)), herbicídnu rezistenciu (EP-A-0242246) a glukorurodidázovú (GUS) expresiu (EP-A-0344029). Expresia markerového génu je výhodne kontrolovaná druhým promótorom, ktorý umožňuje expresiu buniek iných ako je tapetum, a tak umožňuje selekciu buniek alebo tkaniva, obsahujúcich marker v akomkoľvek štádiu regenerácie rastliny. Preferovaný druhý promótor je odvodený od génu, ktorý kóduje 35S podjednotku obalového proteínu vírusu karfiolovej mozaiky (Cauliflower Mosaic Virus - CaMV). Môže však byť použitý akýkoľvek iný vhodný druhý promótor.

Celá rastlina môže byť regenerovaná z jedinej transformovanej rastlinnej bunky a vynález preto poskytuje transgénne rastliny (alebo ich časti ako je rozmnožovací materiál), obsahujúce DNA podľa vynálezu ako je uvedená vyššie. Regenerácia môže byť vykonaná známymi metódami.

V jednom vyhotovení vynálezu môže byť natívny acyltransferázový gén transgéennej rastliny, ktorý zodpovedá transgénu urobený aspoň čiastočne neoperatívnym alebo môže byť

odstránený. Tak, ak transgén kóduje 2-acyltransferázu, môže sa rastlinná natívna 2-acyltransferáza stať neoperatívnu, napríklad, technikami "antisense" alebo ribozýmovou technikou, ktoré sú v odbore známe.

Prostriedkami podľa vynálezu môžu byť produkované rastliny, vytvárajúce olej so stanoveným obsahom lipidov. Napríklad lipidové zloženie triacylglyceridov v rastline môže byť podstatne zmenené za produkcie triglyceridov s požadovanou mastnou kyselinou (napríklad kyselinou erukovou) v určitom obsahu, ktorý je vyšší ako bolo doteraz možné. Napríklad olejnaté semená repky (B. napus) môžu byť transformované za vzniku oleja, ktorého triacylglycerid má obsah erukovej kyseliny nad 70 %.

Je zrejmé, že rastliny so zvýšenými hladinami lipidov môžu byť produkované prostriedkami podľa predloženého vynálezu. Avšak vynález je tiež vhodný na produkciu rastlín so zníženými hladinami lipidov, ktoré môžu byť požadované ak sú žiaduce zvýšené hladiny proteínu a/alebo škrobu. Znížené hladiny lipidov môžu byť dosiahnuté interferovaním so správnou funkciou génu, kódujúceho 2-acyltransferázu, napríklad "antisense" alebo ribozýmovou technológiou. (Takéto rastliny s redukovanými lipidmi môžu byť, ak je to žiaduce, ďalej spracovávané pre vyšší obsah proteínu a/alebo škrobu, ak je to žiaduce).

Promótoary, ktoré prirodzene poháňajú 2-acyltransferázy, môžu byť tiež získané hybridizáciou a/alebo reštrikciou a/alebo sekvenčnými štúdiami za použitia sekvencie na obr. 1.

Vynález umožňuje produkciu proteínu kódovaného DNA podľa prvého aspektu predloženého vynálezu, ktorý je žiadaný. Proteín môže byť exprimovaný hosťiteľskými bunkami nesúcimi DNA vo forme expresného vektoru. Proteín, ktorým môže byť enzým, majúci aktivitu 2-acyltransferázy, môže mať aminokyselinovú sekvenciu, ktorá je zhodná, alebo homológna so sekvenciou na obr. 1. Stupeň homológie bude všeobecne väčší ako u známych proteínov a musí byť aspoň 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 alebo 99 %.

Preferované rysy každého aspektu predloženého vynálezu sú pre každý ďalší aspekt mutatis mutandis.

Vynález je ilustrovaný nasledujúcimi príkladmi. Príklady sa opierajú o pripojené obrázky.

Popis obrázkov na pripojených výkresoch

- Obr. 1 predstavuje cDNA sekvenciu získanú v príklade 1 (SEQ ID: 1) a jej odvodenú proteínovú sekvenciu (SEQ ID: 2).
- Obr. 2 predstavuje sekvenciu zoskupenia časti génových produktov z plsB (SEQ ID: 3) a plsC (SEQ ID: 4) s časťou sekvencie uvedenej na obr. 1 (SEQ ID: 5), ukazujúcu konzervovaný motív. plsB je E. coli sn-glycerol-3-fosfát acyltransferázového génu a plsC 1-acyl-sn-glycerol-3-fosfát acyltransferázového génu E. coli. Dvojbodky označujú presné porovnanie medzi dvoma sekvenciami a jediná bodka konzervatívne aminokyselinové substitúcie. Hviezdičky označujú zhodné aminokyseliny vo všetkých troch sekvenciách a zvyšky konzervované v dvoch z troch sekvencií sú označené symbolom +.
- Obr. 3A, 3B a 3C: Membránové fosfolipidy z E. coli kmeňov boli extrahované do chloroformu a oddelené 2-rozmernou chromatografiou na tenkej vrstve. Prvý rozmer (vzostupný) bol vyvíjaný za použitia chloroformu : metanolu : vody (65 : 25 : 4) a druhý rozmer (zľava doprava) bol vyvíjaný chloroformom : metanolom : kyselinou octovou (65 : 25 : 10). Fosfolipidy boli vizualizované autorádiografiou po 16 hod. pri -70 °C za použitia Fuji RX filmu. E. coli kmene, ktoré boli použité (obr. 3A): JC201, ktorý nesie termosenzitívnu mutáciu v 1-acyl-sn-glycerol-3-fosfát acyltransferázovom géne; (obr. 3B): JC201, obsahujúci plazmid pPLSC, ktorý kóduje E. coli 1-acyl-sn-glycerol-3-fosfát

acyltransferázový gén; (obr. 3C): JC201, obsahujúci plazmid, ktorého cDNA inzertová sekvencia je uvedená na obr. 1 LPA, lyzofosfatidická kyselina; PE, fosfatidyletanolamín; CL, cardiolipín; PG, fosfatidylglycerol; PA, fosfatidická kyselina; O, pôvod. 20 % ^{32}P je inkorporované v LPA v JC201 a zvyšná zodpovedajúca hladina je inkorporovaná v PE v obidvoch ďalších kmeňoch.

Obr. 4 Acyltransferázové skúšky boli vykonané za použitia ^{32}P -značenej lyzofosfatidickej kyseliny, ktorá bola extrahovaná z E. coli kmeňa JC201 a oleoyl CoA ako acyl-donoru. Fosfolipidy prítomné v reakčných zmesiach boli extrahované do chloroformu a oddelené za použitia silikagelovej chromatografie na tenkej vrstve. Pre vyvíjanie dosiek bol použitý chloroform : metanol : kyselina octová : voda (25 : 15 : 4 : 2). Fosfolipidy boli vizualizované autorádiografiou po 6 hod. pri -70 °C za použitia Fuji RX filmu. Použitými E. coli kmeňmi boli: JC201, ktorý nesie termosenzitívnu mutáciu v 1-acyl-sn-glycerol-3-fosfát acyltransferázovom géne JC201, obsahujúci plazmid pPLSC, ktorý kóduje E. coli 1-acyl-sn-glycerol-3-fosfát acyltransferázový gén; JC201, obsahujúci plazmid, ktorého kukuričná cDNA inzertová sekvencia je uvedená na obr. 1 LPA, lyzofosfatidická kyselina; PA, fosfatidická kyselina.

Obr. 5 Predstavuje porovnanie proteínovej sekvencie uvedenej na obr. 1 (SEQ ID: 6) so sekvenciou odvodenou (SEQ ID: 7) z B. napus semenového cDNA inzertu, ktorý bol izolovaný pri DNA hybridizácii k sekvencii kukuričnej cDNA. Sekvencie boli zoradené pomocou Fasta zoraďovacieho programu (1988). Dvojbodky označujú zhočné aminokyseliny a jednotlivé bodky konzervatívne aminokyselinové substitúcie.

kukurica = 374 ak vs. repka = 311 ak

51,5 % identita, optimalizované skóre: 705

Príklady vyhotovenia vynálezu

Príklad 1

Derivácia cDNA sekvencie z obr. 1

Komplementačná štúdia za použitia kukuričnej cDNA expresnej knižnice transferovanej do *E. coli* mutantu JC201 umožňujú izoláciu plazmidu, kódujúceho 2-acyltransferázový enzým z kukurice. cDNA inzert tohto plazmidu má veľkosť 1,6 kb a obsahujú pólmi A koniec veľkosti 70 bp. Inzert bol sekvenovaný za poskytnutia uvedených dát a translácia sekvencie odhaľuje prítomnosť iba jedného veľkého otvoreného čítacieho rámčeka. Toto je znázornené na obr. 1 s navrhnutým štart metionínom a stop kodónom v rámčeku. 2-acyltransferáza je veľkosti 374 aminokyselín a sekvenovanie v smere otvoreného čítacieho rámčeka ukazuje, že proteín je exprimovaný ako časť fúzneho proteínu v *E. coli*. Tento tvorí 10 aminokyselín β -galaktozidázového proteínu, 43 aminokyselín (uvedené v sekvencii), zodpovedajúcich 5'-netranslatovanému regiónu mRNA a 374 aminokyselín proteínu. Porovnanie proteínových sekvencií vo veľkom otvorenom čítacom rámčeku s 2-acyltransferázou *E. coli* ukazuje malú celkovú identitu, ale je tu rozsah 80 zvyškov, ktorý má veľkú hladinu konzervatívnej substitúcie a obsahuje niektoré aminokyseliny, ktoré sú konzervované v 2-acyltransferáze, 1-acyltransferáze a N-acetylglukózamín acyltransferázy *E. coli*.

Príklad 2

Inkorporácia ^{32}P do celkových fosfolipidov

E. coli kmene boli kultivované v minimálnom médiu, obsahujúcom ^{32}P ortofosfát. Celkové fosfolipidy boli extrahované do organických rozpúšťadiel a oddelené 2D chromatografiou na tenkej vrstve (obr. 3) (lyzofosfatidická kyselina (LPA)) je

substrát pre 2-acyltransferázu (2-AT).

Ako je zrejmé z obr. 3A, akumulácia ^{32}P -značenej LPA v mutante JC201 ilustruje neprítomnosť plne funkčnej 2-AT. Adíciou plazmidu, nesúceho buď natívny *E. coli* gén (obr. 3B) alebo kukuričný klon uvedený na obr. 1 (obr. 3C) navracia 2-AT aktivitu bunkám, umožňujúcu LPA, aby bola odstránená a ďalej metabolizovaná (lyzofosfatidická kyselina).

Tieto údaje ukazujú, že DNA sekvencia uvedená na obr. 1 kóduje 2-AT.

Príklad 3

Nadexpresia cDNA

cDNA región špecifikujúci proteínovú sekvenciu uvedenú na obr. 1 bol klonovaný do *E. coli* nadexpresného vektoru pET11d (Studier a spol., Meth. Enzymol. 185, 60 - 89 (1990)). Zvýšená 2-acyltransferázová aktivita po indukcii expresie z plazmidového inzertu potvrdzuje, že sekvencia na obr. 1 je sekvencia 2-AT.

Príklad 4

Lokalizácia 2-AT aktivity v *E. coli* bunkách, obsahujúcich kukuričný klon

Boli vykonané 2-acyltransferázové štúdie s použitím membrán izolovaných z mutantu kmeňa JC.201, ktorý nemá 2-AT a z JC.201, obsahujúceho kukuričný plazmid (obr. 4). 2-AT aktivita nebola detegovaná v membránových frakciách z JC.201. Adícia plazmidu nesúceho natívny *E. coli* gén alebo sekvenciu uvedenú na obr. 1, k JC.201 vedie k navráteniu 2-AT aktivity membránam.

Príklad 5

Použitie kukuričnej cDNA ako heterológnej sondy na získanie cDNA z olejnatých semien repky

Knižnica semenovej cDNA z Brassica napus bola screenovaná sekvenciou uvedenou na obr. 1 s použitím štandardných techník (Sambrook a spol., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2. vydanie, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)).

Podmienky

Na hybridizáciu kukuričného cDNA inzertu do repkovej knižnice: hybridizácia bola v 6 x SSC, 5 x Denhardtov roztok, 0,5 % SDS, 0,5 % pyrofosforečnan tetrasodný a 50 µg/ml denaturovanej DNA sledích speriem. Filtre boli premývané 2 x 30 minút pri 65 °C v 1 x SSC, 0,1 % SDS a 1 x 30 minút v 0,2 x SSC, 0,1 % SDS pri 65 °C.

Hybridizujúci klon bol sekvenovaný a proteínová sekvencia odvodená od veľkého ORF. Spojenie tejto proteínovej sekvencie so sekvenciou odvodenou z kukuričného cDNA klonu uvedenou na obr. 1, je uvedené na obr. 5.

Silná identita medzi týmito sekvenciami ilustruje potenciál použitia sekvencie uvedenej na obr. 1 na získanie ďalšej 2-ATS.

Príklad 6

Transgénne rastliny

Sekvencia uvedená na obr. 1 môže byť klonovaná tesne vedľa vhodného promotora, do vhodného vektoru na expresiu do rastlín. Vektor môže byť použitý k transformovaniu rastlín a výsledné rastliny exprimujúce 2-AT môžu byť analyzované na obsah lipidov. Lipidový metabolizmus sa očakáva ako preregulovaný a zvýšené hladiny lipidov boli detegovateľné v semenách.

Príklad 7

Antisense

Sekvencia uvedená na obr. 1 môže byť klonovaná tesne vedľa vhodného promótoru, v antisense orientácii do vhodného sektoru na expresiu v rastlinách. Vektor môže byť použitý na transformovanie rastlín a výsledné rastliny exprimujúce 2-AT môžu byť analyzované na proteín a obsah škrobu. Zvýšené hladiny škrobu a proteínu sú pokladané za detegovateľné v semenách.

Príklad 8

Potlačenie natívnej 2-AT

DNA sekvencia 2-AT odvodená od *L. douglassi* (získaná ako je popísané v príklade 5) môže byť zavedená do olejnej repky (OSR) za expresie vhodného promótoru, za použitia vektorov a metód transformácie rastlín, ktoré sú v odbore dobre známe. Druhá sekvencia, obsahujúca "antisense" alebo ribozýmy voči repkovej cDNA (príklad 5) môže byť zavedená na súčasnú expresiu. Výsledná transformovaná rastlina je pokladaná za majúcu 2-AT aktivitu, zodpovedajúcu aktivite *L. douglassi*, so súčasným potlačením natívneho repkového 2-AT génu.

Modifikovaná OSR rastlina takto získaná mala vyššie hladiny erukovej kyseliny v polohe 2 svojich triacylglycerolov ako majú pôvodné rastliny. Navyše boli nájdené vyššie hladiny trierucínu v oleji semien.

Príklad 9

Screening genómovej knižnice

Sekvencia uvedená na obr. 1 sa použije k screeningu genómovej knižnice *Arabidopsis* a hybridu získaného použitím

klonu. Za použitia štandardných techník môže byť z tohto klonu získaný promótor. Promótor môže byť použitý na pôsobenie na expresiu v rastlinných bunecných membránach.

Zoznam sekvencií

(1) Všeobecná informácia:

(i) Prihlasovateľ:

(A) Meno: Nickerson BIOCEM Limited

(nielen US)

(B) Ulica: Cambridge Science Park, Milton Road

(C) Mesto: Cambridge

(E) Zem: United Kingdom

(F) Poštový kód: (ZIP) CB4 4GZ

(A) Meno: SLABAS, Antoni Ryszard

(len US)

(B) Ulica: 8 Telford Close, High Shincliffe

(C) Mesto: Durham

(E) Zem: United Kingdom

(F) Poštový kód: (ZIP) DH1 2YJ

(A) Meno: BROWN, Adrian Paul

(iba US)

(B) Ulica: 4 Church Villas, Shadforth

(C) Mesto: Durham

(E) Zem: United Kingdom

(F) Poštový kód: (ZIP) DH6 1LQ

(ii) Názov vynálezu: DNA kódujúca 2-acyltransferázy

(iii) Počet sekvencií: 7

(iv) Počítačova čítacia forma:

- (A) Typ média: Floppy disk
- (B) Počítač: IBM PC compatible
- (C) Operačný systém: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

- (v) Údaje o prihláške:
Číslo prihlášky: WO PCT (BG93)

(2) Informácie o SEQ ID No: 1:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) Dĺžka: 1514 párov báz
- (B) Typ: nukleová kyselina
- (C) Reťazec: dvojitý
- (D) Topológia: lineárna

(ii) Typ molekuly: cDNA

(ix) Rysy:

- (A) Meno/klúč: CDS
- (B) Lokácia: 130..1254

(xi) Popis sekvencie: SEQ ID NO: 1:

```
CCCCGTCCCTC CTCGTGCGCCG GCGGAGCCGC CTA CTATCGC CTGGAGAAGG AGCGCCGCGG      60
GGAGCTTTTC CCACTGCCGA CTGCCGTCTG ACCCTCCGAG ATCGGAAGCG GCGCCGGCGC      120
CGGCCGGCG ATG GCG ATC CCG CTC GTG CTC GTC GTG CTC CCG CTC GGC      180
      Met Ala Ile Pro Leu Val Leu Val Val Leu Pro Leu Gly
          1                5                10
```

CTG CTC TTC CTC CTG TCC GGC CTC ATC GTC AAC GCC ATC CAG GCC GTC Leu Leu Phe Leu Leu Ser Gly Leu Ile Val Asn Ala Ile Gln Ala Val 15 20 25	216
CTA TTT GTG ACG ATA AGG CCC TTT TCG AAG AGC TTC TAC CGT CGG ATC Leu Phe Val Thr Ile Arg Pro Phe Ser Lys Ser Phe Tyr Arg Arg Ile 30 35 40 45	264
AAC AGA TTC TTG GCC GAG CTG CTG TGG CTT CAG CTT GTC TGG GTG GTG Asn Arg Phe Leu Ala Glu Leu Leu Trp Leu Gln Leu Val Trp Val Val 50 55 60	312
GAC TGG TGG GCA GGT GTT AAG GTA CAA CTG CAT GCA GAT GAG GAA ACT Asp Trp Trp Ala Gly Val Lys Val Gln Leu His Ala Asp Glu Glu Thr 65 70 75	360
TAC AGA TCA ATG GGT AAA GAG CAT GCA CTC ATC ATA TCA AAT CAT CGG Tyr Arg Ser Met Gly Lys Glu His Ala Leu Ile Ile Ser Asn His Arg 80 85 90	408
AGT GAT ATT GAT TGG CTC ATT GGA TGG ATA TTG GCC CAG CGT TCA GGG Ser Asp Ile Asp Trp Leu Ile Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly 95 100 105	456
TGC CTT GGA AGT ACA CTT GCT GTC ATG AAG AAG TCA TCC AAG TTC CTT Cys Leu Gly Ser Thr Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu 110 115 120 125	504
CCA GTT ATT GGC TGG TCA ATG TGG TTT GCA GAG TAC CTC TTT TTG GAA Pro Val Ile Gly Trp Ser Met Trp Phe Ala Glu Tyr Leu Phe Leu Glu 130 135 140	552
AGG AGC TGG GCC AAG GAT GAA AAG ACA CTA AAG TGG GGT CTC CAA AGG Arg Ser Trp Ala Lys Asp Glu Lys Thr Leu Lys Trp Gly Leu Gln Arg 145 150 155	600
TTG AAA GAC TTC CCT AGA CCA TTT TGG CTA GCT CTT TTC GTC GAG GGT Leu Lys Asp Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly 160 165 170	648
ACT CSC TTT ACT CCA GCA AAG CTT CTC GCA GCT CAG GAA TAT GCG GCC Thr Arg Phe Thr Pro Ala Lys Leu Leu Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala 175 180 185	696
TCC CAG GGC TTA CCG GCT CCT AGA AAT GTA CTT ATT CCA CGT ACC AAG Ser Gln Gly Leu Pro Ala Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys 190 195 200 205	744
GGA TTT GTA TCT GCT GTA AGT ATT ATG CGA GAT TTT GTT CCA GCC ATT Gly Phe Val Ser Ala Val Ser Ile Met Arg Asp Phe Val Pro Ala Ile 210 215 220	792
TAT GAT ACA ACT GTA ATA GTC CCT AAA GAT TCC CCT CAA CCA ACA ATG Tyr Asp Thr Thr Val Ile Val Pro Lys Asp Ser Pro Gln Pro Thr Met 225 230 235	840
CTG CGG ATT TTG AAA GGG CAA TCA TCA GTG ATA CAT GTC CGC ATG AAA Leu Arg Ile Leu Lys Gly Gln Ser Ser Val Ile His Val Arg Met Lys 240 245 250	888
CST CAT GCA ATG AGT GAG ATG CCA AAA TCA GAT GAG GAT GTT TCA AAA Arg His Ala Met Ser Glu Met Pro Lys Ser Asp Glu Asp Val Ser Lys 255 260 265	936

TGG TGT AAA GAC ATT TTT GTG GCA AAG GAT GCC TTA CTG GAC AAG CAT	984
Trp Cys Lys Asp Ile Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His	
270 275 280 285	
TTG GCA ACA GGC ACT TTC GAT GAG GAG ATT AGA CCT ATT GGC CGT CCA	1032
Leu Ala Thr Gly Thr Phe Asp Glu Glu Ile Arg Pro Ile Gly Arg Pro	
290 295 300	
GTG AAA TCA TTG CTG GTG ACC CTG TTC TGG TCG TGC CTC CTG CTG TTT	1080
Val Lys Ser Leu Leu Val Thr Leu Phe Trp Ser Cys Leu Leu Leu Phe	
305 310 315	
GGC GCC ATC GAG TTC TTC AAG TGG ACA CAG CTT CTG TCG ACG TGG AGG	1128
Gly Ala Ile Glu Phe Phe Lys Trp Thr Gln Leu Leu Ser Thr Trp Arg	
320 325 330	
GGT GTG GCG TTC ACT GCC GCA GGG ATG GCG CTT GTG ACG GGT GTC ATG	1176
Gly Val Ala Phe Thr Ala Ala Gly Met Ala Leu Val Thr Gly Val Met	
335 340 345	
CAT GTC TTC ATC ATG TTC TCC CAG GCT GAG CGG TCG AGC TCA GCC AGG	1224
His Val Phe Ile Met Phe Ser Gln Ala Glu Arg Ser Ser Ser Ala Arg	
350 355 360 365	
GCG GCA CGG AAC CGG GTC AAG AAG GAA TGAAAAATGG AGGGTGGAGA	1271
Ala Ala Arg Asn Arg Val Lys Lys Glu	
370 375	
TGAGGTTCTC GTGGGGTTTG TTATGGGCAA CTTTCAAAG GACTCTCCAT TCATATTAGT	1331
ATTAATTTCAT ATATATGCAG CCCCCAATTC CAGACATTGA TATGCTCTCA AATAGGATGT	1391
TCTGCTCCCC TCTTGTATTT GTATGCAGGA AAGGGTTTGT AGGGAGTTTA CCCCCCCCCC	1451
CCCCCCCCCCC GCCTTTCTTT GGGGAAGAAA GACATATTCT GGAAGCCTTC CAGTAGTTCA	1511
AAA	1514

(2) Informácie o SEQ ID NO: 2:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) dĺžka: 374 aminokyselín

(B) typ: aminokyselina

(D) topológia: lineárna

(ii) typ molekuly: proteín

(xi) Popis sekvencie SEQ ID NO 2: 1 2:

Met Ala Ile Pro Leu Val Leu Val Val Leu Pro Leu Gly Leu Leu Phe
1 5 10 15
Leu Leu Ser Gly Leu Ile Val Asn Ala Ile Gln Ala Val Leu Phe Val
20 25 30
Thr Ile Arg Pro Phe Ser Lys Ser Phe Tyr Arg Arg Ile Asn Arg Phe
35 40 45
Leu Ala Glu Leu Leu Trp Leu Gln Leu Val Trp Val Val Asp Trp Trp
50 55 60
Ala Gly Val Lys Val Gln Leu His Ala Asp Glu Glu Thr Tyr Arg Ser
65 70 75 80
Met Gly Lys Glu His Ala Leu Ile Ile Ser Asn His Arg Ser Asp Ile
85 90 95
Asp Trp Leu Ile Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
100 105 110
Ser Thr Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
115 120 125
Gly Trp Ser Met Trp Phe Ala Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Ser Trp
130 135 140
Ala Lys Asp Glu Lys Thr Leu Lys Trp Gly Leu Gln Arg Leu Lys Asp
145 150 155 160
Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
165 170 175
Thr Pro Ala Lys Leu Leu Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Gln Gly
180 185 190
Leu Pro Ala Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val
195 200 205
Ser Ala Val Ser Ile Met Arg Asp Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Thr
210 215 220
Thr Val Ile Val Pro Lys Asp Ser Pro Gln Pro Thr Met Leu Arg Ile
225 230 235 240
Leu Lys Gly Gln Ser Ser Val Ile His Val Arg Met Lys Arg His Ala
245 250 255
Met Ser Glu Met Pro Lys Ser Asp Glu Asp Val Ser Lys Trp Cys Lys
260 265 270
Asp Ile Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Leu Ala Thr
275 280 285

Gly Thr Phe Asp Glu Glu Ile Arg Pro Ile Gly Arg Pro Val Lys Ser
290 295 300

Leu Leu Val Thr Leu Phe Trp Ser Cys Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile
305 310 315 320

Glu Phe Phe Lys Trp Thr Gln Leu Leu Ser Thr Trp Arg Gly Val Ala
325 330 335

Phe Thr Ala Ala Gly Met Ala Leu Val Thr Gly Val Met His Val Phe
340 345 350

Ile Met Phe Ser Gln Ala Glu Arg Ser Ser Ser Ala Arg Ala Ala Arg
355 360 365

Asn Arg Val Lys Lys Glu
370

(2) Informácie o ID NO: 3:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) dĺžka: 15 aminokyselín

(B) typ: aminokyselina

(D) topológia: lineárna

(ii) typ molekuly: proteín

(xi) Popis sekvencie SEQ ID NO: 3:

Tyr Phe Val Glu Gly Gly Arg Ser Arg Thr Gly Arg Leu Leu Asp
1 5 10 15

(2) Informácie o SEQ ID NO: 4:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) dĺžka: 15 aminokyselín
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topológia: lineárna

(ii) typ molekuly: proteín

(xi) Popis sekvencie SEQ ID NO: 4:

Met	Phe	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg	Ser	Arg	Gly	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro
1				5					10					15

(2) Informácie o SEQ ID NO: 5:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) dĺžka: 15 aminokyselín
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topológia: lineárna

(ii) typ molekuly: proteín

(xi) Popis sekvencie : SEQ ID NO: 5:

Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe Thr Pro Ala Lys Leu Leu Ala
1 5 10 15

(2) Informácie o SEQ ID NO: 6:

(i) Charakteristiky sekvencie:

- (A) dĺžka: 374 aminokyselín
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topológia: lineárna

(ii) typ molekuly: proteín

(xi) Popis sekvencie SEQ ID NO: 6:

Met Ala Ile Pro Leu Val Leu Val Val Leu Pro Leu Gly Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Ser Gly Leu Ile Val Asn Ala Ile Gln Ala Val Leu Phe Val
20 25 30

Thr Ile Arg Pro Phe Ser Lys Ser Phe Tyr Arg Arg Ile Asn Arg Phe
35 40 45

Leu Ala Glu Leu Leu Trp Leu Gln Leu Val Trp Val Val Asp Trp Trp
50 55 60

Ala Gly Val Lys Val Gln Leu His Ala Asp Glu Glu Thr Tyr Arg Ser
65 70 75 80

Met Gly Lys Glu His Ala Leu Ile Ile Ser Asn His Arg Ser Asp Ile
85 90 95

Asp Trp Leu Ile Gly Trp Ile Leu Ala Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
100 105 110

Ser Thr Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
115 120 125

Gly Trp Ser Met Trp Phe Ala Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Ser Trp
130 135 140

Ala Lys Asp Glu Lys Thr Leu Lys Trp Gly Leu Gln Arg Leu Lys Asp
145 150 155 160

Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
165 170 175

Thr Pro Ala Lys Leu Leu Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Gln Gly
180 185 190

Leu Pro Ala Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val
195 200 205

Ser Ala Val Ser Ile Met Arg Asp Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Thr
210 215 220

Thr Val Ile Val Pro Lys Asp Ser Pro Gln Pro Thr Met Leu Arg Ile
225 230 235 240

Leu Lys Gly Gln Ser Ser Val Ile His Val Arg Met Lys Arg His Ala
245 250 255

Met Ser Glu Met Pro Lys Ser Asp Glu Asp Val Ser Lys Trp Cys Lys
260 265 270

Asp Ile Phe Val Ala Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Leu Ala Thr
275 280 285

Gly Thr Phe Asp Glu Glu Ile Arg Pro Ile Gly Arg Pro Val Lys Ser
290 295 300

Leu Leu Val Thr Leu Phe Trp Ser Cys Leu Leu Leu Phe Gly Ala Ile
305 310 315 320

Glu Phe Phe Lys Trp Thr Gln Leu Leu Ser Thr Trp Arg Gly Val Ala
325 330 335

Phe Thr Ala Ala Gly Met Ala Leu Val Thr Gly Val Met His Val Phe
340 345 350

Ile Met Phe Ser Gln Ala Glu Arg Ser Ser Ser Ala Arg Ala Ala Arg
355 360 365

Asn Arg Val Lys Lys Glu
370

(2) Informácie o SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristiky sekvencie:

(A) dĺžka: 295 aminokyselín

(B) typ: aminokyselina

(D) topológia: lineárna

(ii) typ molekuly: proteín

(xi) Popis sekvencie SEQ ID NO: 7:

Met Ala Met Ala Ala Val Ile Val Pro Leu Gly Ile Leu Phe Phe
1 5 10 15
Ile Ser Gly Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Arg Ser Gly Cys Leu Gly
20 25 30
Ser Ala Leu Ala Val Met Lys Lys Ser Ser Lys Phe Leu Pro Val Ile
35 40 45
Gly Trp Ser Met Trp Phe Ser Glu Tyr Leu Phe Leu Glu Arg Asn Trp
50 55 60
Ala Lys Asp Glu Ser Thr Leu Lys Ser Gly Leu Gln Arg Leu Asn Asp
65 70 75 80
Phe Pro Arg Pro Phe Trp Leu Ala Leu Phe Val Glu Gly Thr Arg Phe
85 90 95
Thr Glu Ala Lys Leu Lys Ala Ala Gln Glu Tyr Ala Ala Ser Ser Glu
100 105 110
Leu Pro Val Pro Arg Asn Val Leu Ile Pro Arg Thr Lys Gly Phe Val
115 120 125
Ser Ala Val Ser Asn Met Arg Ser Phe Val Pro Ala Ile Tyr Asp Met
130 135 140
Thr Val Ala Ile Pro Lys Thr Ser Pro Pro Thr Met Leu Arg Leu
145 150 155 160
Phe Lys Gly Gln Pro Ser Val Val His Val His Ile Lys Cys His Ser
165 170 175
Met Lys Asp Leu Pro Glu Ser Glu Asp Glu Ile Ala Gln Trp Cys Arg
180 185 190
Asp Gln Phe Val Thr Lys Asp Ala Leu Leu Asp Lys His Ile Ala Ala
195 200 205
Asp Thr Phe Ala Gly Gln Lys Glu Gln Asn Ile Gly Arg Pro Ile Lys
210 215 220
Ser Leu Ala Val Val Leu Ser Trp Ala Cys Leu Leu Thr Leu Gly Ala
225 230 235 240
Met Lys Phe Leu His Trp Ser Asn Leu Phe Ser Ser Trp Lys Gly Ile
245 250 255
Ala Leu Ser Ala Leu Gly Leu Gly Ile Ile Thr Leu Cys Met Gln Ile
260 265 270
Leu Ile Arg Ser Ser Gln Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ala Lys Val Ala
275 280 285
Pro Ala Lys Pro Lys Asp Asn
290 295

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Rekombinantná alebo izolovaná DNA sekvencia vybraná z
 - (i) DNA sekvencie, obsahujúcej DNA sekvenciu z obr. 1, kódujúcej aspoň od Met₄₄ do Stop₄₁₈ (SEQ ID:2) alebo jej komplementárny reťazec,
 - (ii) nukleokyselinovej sekvencie hybridizujúcej k DNA sekvencii z obr. 1 (SEQ ID: 1) alebo jej komplementárnemu reťazcu za prísnych podmienok a
 - (iii) nukleokyselinovej sekvencie, ktoré by mali hybridizovať k DNA sekvencii z obr. 1 (SEQ ID: 1) alebo jej komplementárnemu reťazcu, ale za degenerácie genetického kódu.
2. DNA sekvencia podľa nároku 1, ktorá kóduje enzým, majúci membránovo viazanú acyltransferázovú aktivitu.
3. DNA sekvencia podľa nároku 2, v ktorej acyltransferázová aktivita je 2-acyltransferázová aktivita.
4. Izolovaný proteín, ktorý je expresným produktom DNA sekvencie podľa nároku 1, 2 alebo 3.
5. Protilátka schopná špecifického nadviazania k proteínu podľa nároku 4.
6. Rastlina, majúca jeden alebo viac nerozpustných acyltransferázových enzýmov, majúcich substrátovú špecifitu, ktorá sa odlišuje od natívneho enzýmu rastliny.

7. Rastlina podľa nároku 6, ktorá je transgénna pre nerozpustný acyltransferázový enzým z iných druhov.

8. Rastlina podľa nároku 6 alebo 7, ktorou je repka, kukurica, slnečnica alebo sója.

9. Rastlina podľa nároku 7, kde uvedeným iným druhom je druh rodu *Limnathes* ako je *L. alba* alebo výhodne *L. douglassi*, alebo *Crambe*.

10. Rastlina podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 až 9, kde nerozpustným acyltransferázovým enzýmom je 2-acyl-transferáza.

11. Rastlina podľa nároku 10, kde 2-acyltransferáza má vyššiu špecifitu pre kyselinu erukovú ako prirodzený enzým rastliny.

12. Rastlina podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 až 11, kde uvedený prirodzený enzým sa aspoň čiastočne stane neoperatívny alebo je odstránený, napríklad ribozýmom alebo antisense nukleovou kyselinou.

13. Spôsob získania oleja, vyznačujúci sa tým, že zahrňuje kultiváciu rastliny podľa ktoréhokoľvek z nárokov 6 až 12 a zber oleja produkovaného rastlinou alebo jej časťou, hlavne semenami.

14. Mikrobiálny hositeľ schopný expresie DNA sekvencie podľa nároku 1, 2 alebo 3.

15. Proteín, ktorý je v podstate homológny k proteínu podľa nároku 4.

16. Fragment DNA sekvencie podľa nároku 1, 2 alebo 3, obsahujúci aspoň 15 nukleotidov.

17. DNA, kódujúca RNA, ktorá je v opačnom smere (antisense)

k RNA, kódovanej DNA podľa nároku 1, 2 alebo 3.

18. DNA, kódujúca ribozým špecifický k RNA, kódovanej DNA podľa nároku 1, 2 alebo 3.

19. Izolovaná alebo rekombinantná DNA, obsahujúca promótor, ktorý prirodzene poháňa expresiu génu k produkcii proteínu podľa nároku 4 alebo 15.

Obr. 1 (1/3)

1/1	CCC CGT CCT CGT CGC CGG CGG AGC CGC CTA CTA TCG CCT GGA GAA GGA GCG CCG CGG CGG	31/11	CGG CTA L L S P G E G A P R
61/21	GGA GCT TTT CCC ACT GCC GAC TGC CGT CTG ACC CTC CGA GAT CGG AAG CGG CGC CGG CGC	91/31	CGG AAG CGG CGC CGG CGC CGG CGC
121/41	CGG CCG GCG ATG GCG ATC CCG CTC GTG CTC GTC GTG CTC CCG CTC GGC CTG CTC TTC CTC	151/51	CGG CTC GGC CTG CTC TTC CTC
181/61	CTG TCC GGC CTC ATC GTC AAC GCC ATC CAG GCC GTC CTA TTT GTG ACG ATA AGG CCC TTT	211/71	AGG CCC TTT
241/81	TCG AAG AGC TTC TAC CGT CGG ATC AAC AGA TTC TTG GCC GAG CTG CTG TGG CTT CAG CTT	271/91	CTT CAG CTT
301/101	GTC TGG GTG GAC TGG TGG GCA GGT GTT AAG GTA CAA CTG CAT GCA GAT GAG GAA ACT	331/111	GAG GAT GAA ACT
361/121	TAC AGA Y R S M G K E H A L I I S N H R S D I D	391/131	GAT ATT GAT
421/141	TGG CTC ATT GGA TGG ATA TTG GCC CAG CGT TCA GGG TGC CTT GGA AGT ACA CTT GCT GTC	451/151	GTC GCT GTC
481/161	ATG AAG AAG TCA TCC AAG TTC CTT CCA GTT AAT GGC TGG TCA ATG TGG TTT GCA GAG TAC	511/171	TAC GAG TAC
541/181	CTC TTT TTG GAA AGG AGC TGG GCC AAG GAT GAA AAG ACA CTA AAG TGG GGT CTC CAA AGG	571/191	AGG CTC CAA AGG

Obr. 1 2/8
(2/3)

601/201	TTG AAA	GAC TTC	CCT AGA	CCA TTT	TGG CTA	GCT CTT	631/211	TTC GTC	GAG GGT	ACT ACT	CGC TTT	ACT
L K	P R	F L	W L	L L	A L	F F		V E	G T	R R	F F	T T
661/221	CCA GCA	AAG CTT	CTC GCA	GCT CAG	GAA TAT	GCG GCC	691/231	TCC CAG	GGC TTA	CCG GCT	CCT CCA	AGA
P A	L A	A Q	E Y	A A	S A	S Q		G G	L P	A P	P R	
721/241	AAT GTA	CTT ATT	CCA CGT	ACC AAG	GGA TTT	GTA TCT	751/251	GCT GTA	AGT ATT	ATG CGA	GAT TTT	
N V	I P	R T	K G	F V	S A	V S		A V	S I	M R	D F	
781/261	GTT CCA	GCC ATT	TAT GAT	ACA ACT	GTA ATA	GTC CCT	811/271	AAA GAT	TCC CCT	CAA CCA	ACA ATG	
V P	A I	D T	T V	I I	V P	K K		D S	P Q	P T	M M	
841/281	CTG CGG	ATT TTG	AAA GGG	CAA TCA	TCA GTG	ATA CAT	871/291	GTC CGC	ATG AAA	CGT CAT	GCA ATG	
L R	I L	K G	Q S	S V	I H	V V		R M	K R	H A	M M	
901/301	AGT GAG	ATG CCA	AAA TCA	GAT GAT	GTT TCA	AAA TGG	931/311	TGT AAA	GAC ATT	TTT GTG	GCA GCA	
S E	M P	S D	E V	D V	S K	W W		C C	D I	F V	A A	
961/321	AAG GAT	GCC TTA	CTG GAC	AAG CAT	TTG GCA	ACA GGC	991/331	TTC GAT	GAG GAG	ATT AGA	CCT CCT	
K D	A L	D K	H L	A A	T G	T G		F D	E E	I R	P P	
1021/341	ATT GGC	CGT CCA	GTG AAA	TCA TTG	CTG GTG	ACC CTG	1051/351	TGG TCG	TGC CTC	CTG CTG	TTT FTT	
I G	R P	V K	S L	L V	T L	F L		W S	C L	L L	L F	
1081/361	GGC GCC	ATC GAG	TTC AAG	TGG ACA	CAG CTT	CTG TCG	1111/371	ACG TGG	AGG GGT	GTG GCG	TTC TTC	
G A	I E	F F	K W	T Q	L L	S T		W R	G G	V A	A F	

1141/381 ACT GCC GCA GGG ATG GCG CTT GTG ACG GGT GTC ATG CAT GTC TTC ATC ATG TTC TCC CAG
 T A A G M A G A L V T G V M H F I M F S Q
 1201/401 GCT GAG CGG TCG AGC TCA GCC AGG GCG GCA CGG AAC CCG GTC MAG AAG GAA TGA AAA ATG
 A E R S S S A R A A R N R V K K E * K M
 1261/421 GAG GGT GGA GAT GAG GTT CTC GTG GGG TTT GTT ATG GGC MAC CTT CAA AAG GAC TCT CCA
 E G G D E V L V G F V M G N L Q K D S P
 1321/441 TTC ATA TTA GTA TTA ATT CNT ATA TAT GCA GCG CCA AAT TCC AGA CNT TGA TAT GCT CTC
 F I L V L I H I Y A A P N S R H * Y A L
 1381/461 AAA TAG GAT GTT CTG CTC CCC TCT TGT ATT TGT ATG CAG GAA AGG GTT TGT AGG GAG TTT
 K * D V L L P S C I C M Q E R V C R E F
 1441/481 ACC CCC CCC CCC CCC GCC TTT CTT TGG GGA AGA AAG ACA TaT TCT GGA AGC CTT
 T P P P P A F L L W G R R K T Y S G S L
 1501/501 CCA GTA GTT CAA AA
 P V V Q

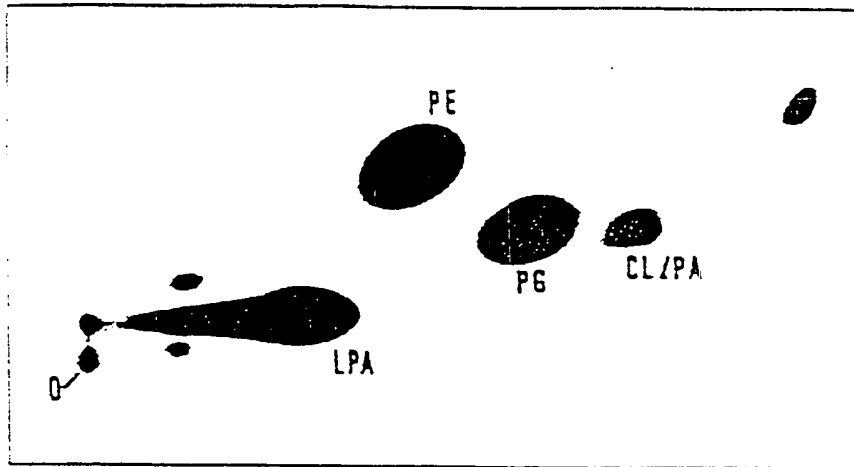
Obr. 1 (3/3)

Obr. 2

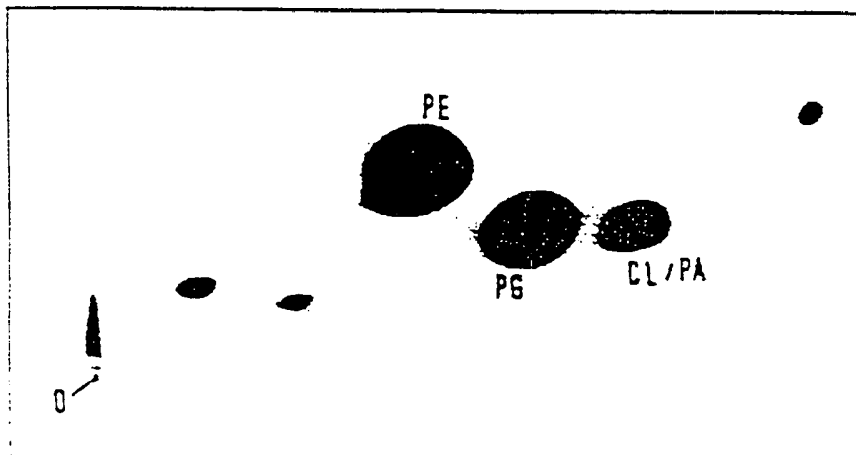
plsb	-	Y	F	V	E	G	G	R	S	R	T	G	R	L	L	D	-
	
plsc	-	M	F	P	E	G	T	R	S	R	G	R	G	L	L	P	-
	
kukurica	-	L	F	V	E	G	T	R	F	T	P	A	K	L	L	A	-
	
		*	*	+	*	+	+	*	+	+				*	*	*	

5 / 8
Obr. 3

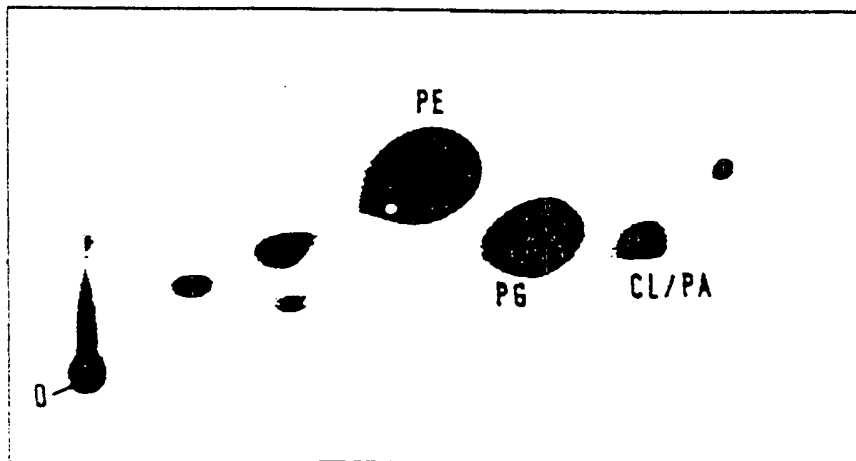
A: mutant
JC201



B: mutant +
pPLSC



C: mutant +
cDNA
kukurica



6 / 8

Obr. 4

