

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **13.09.2000**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.09.1999**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/154182**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.09.2002**
(Věstník č. 9/2002)
(86) PCT číslo: **PCT/US00/25078**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/19976**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1274

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/00

(71) Přihlašovatel:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC, St. Louis, MO,
US;**

(72) Původce:

**Anderson Heather M., St. Louis, MO, US;
Chay Catherine A., St. Louis, MO, US;
Chen Guilan, Wildwood, MO, US;
Cenner Timothy W., Wildwood, MO, US;**

(74) Zástupce:

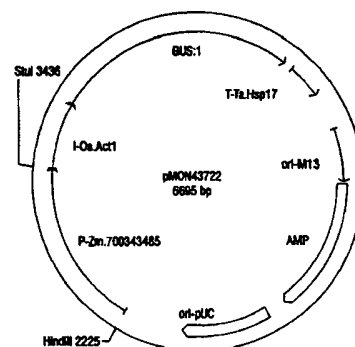
**Matušková Matrina Mgr., Mendlovo nám. 1a, Brno,
60300;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Regulační sekvence pro řízení exprese genu u
rostlin**

(57) Anotace:

Řešení se zabývá sekvencemi nukleové kyseliny pro regulaci genové exprese u rostlin. Zejména se zabývá 5' regulačními sekvencemi, které jsou užitečné pro regulaci exprese heterologní DNA u rostlin, a způsobů identifikace několikanásobných 5' regulačních sekvencí, které dodávají konkrétní profil exprese, když se operativně naváží DNA sekvence. Rovněž se zabývá expresivními vektory, které obsahují 5' regulační sekvence, a dále transgenními rostlinami, které expresní vektory obsahují.



REGULAČNÍ SEKVENCE PRO ŘÍZENÍ EXPRESE GENU U ROSTLIN

44/188

Oblast techniky

Vynález se zabývá izolací a použitím molekul nukleových kyselin pro řízení exprese genu u rostlin, konkrétně se zabývá novými rostlinnými promotory.

Dosavadní stav techniky

Jedním z cílů rostlinného genetického inženýrství je produkce rostlin s agronomicky významnými vlastnostmi nebo rysy. Nedávné pokroky genového inženýrství poskytly potřebné nástroje pro transformaci rostlin tak, aby obsahovaly a přepisovaly cizí geny (Kahl a kol. (1995) World Journal of Microbiology and Biotechnology 11:449-460). Obzvláště žádoucí rysy nebo vlastnosti v genetickém inženýrství zahrnují, ale nejsou omezeny na odolnost proti hmyzu a jiným škůdcům a činitelům způsobujícím nemoci, dále sem patří tolerance na herbicidy, zvýšená stabilita, výnosnost nebo skladovací doba, tolerance na prostředí a nutriční obohacení. Technologické pokroky při transformaci a regeneraci rostlin, umožnily výzkumným pracovníkům odejmout kousky DNA, jako je např. gen nebo geny z heterologního zdroje, nebo z původního zdroje. Tyto části mohou modifikovat na odlišné nebo vylepšené vlastnosti a vložit tuto exogenní DNA do rostlinného genomu. Gen nebo geny mohou poté být přepsány do rostlinné buňky a vykazovat doplněné vlastnost(i) nebo rys(y). V jednom přiblížení může exprese nového genu, který normálně není přepisován v konkrétní rostlině nebo rostlinné tkáni, dodat požadovaný fenotypický efekt. V jiném přiblížení může transkripce genu nebo části genu v pozitivní orientaci vytvořit požadovaný efekt pomocí prevence nebo inhibice exprese genu endogenního.

Izolované rostlinné promotory jsou užitečné při modifikaci rostlin pomocí genového inženýrství za účelem požadovaných fenotypických vlastností. Za účelem produkce takové transgenní rostliny je do rostlinné buňky zaveden vektor, který obsahuje heterologní sekvenci genu, která při expresi do rostlinné buňky dodává požadovaný fenotyp. Vektor také obsahuje rostlinný promotor, který je operativně navázán na heterologní sekvenci genu, často to bývá promotor, který není běžně spojován s heterologním genem. Vektor je poté zaveden do rostlinné buňky za vytvoření transformované rostlinné buňky a tato transformovaná rostlinná buňka se rege-

neruje do transgenní rostliny. Promotor řídí expresi zavedené DNA sekvence, na kterou je promotor operativně navázán, a tak ovlivňuje požadovanou vlastnost dodanou DNA sekvencí.

Protože tento promotor je 5' regulační element, který tvoří nedílnou součást při celkové expresi genu nebo genů, bylo by výhodné mít různé promotory pro uzpůsobení genové exprese tak, aby se gen nebo geny účinně přepisovaly ve správný čas během růstu a vývoje rostliny, v nejlepším místě v rostlině a v množství nezbytném pro dosažení požadovaného efektu. Například v jednom případě může být produkt konstitutivní exprese genu být prospěšný v jednom místě rostliny, ale méně prospěšný v jiné části rostliny. V jiných případech může být prospěšné vytváření genového produktu při určitém stupni vývoje rostliny, nebo jako odpověď na určité podněty prostředí nebo chemické podněty. Komerční vývoj geneticky vylepšené germoplazmy se dostal na úroveň zavedení několika rysů do plodin, často nazývané jako metoda skládání genů (gene stacking approach). Touto metodou lze zavést do rostliny několik genů dodávajících různé námi požadované vlastnosti. Při zavádění několika genů do rostliny je důležité, aby byl každý gen modulovaný nebo řízený pro optimální expresi a aby regulační elementy byly různé pro snížení možnosti ztišení genu, které může být způsobeno rekombinací homologních sekvencí. Z tohoto a jiných skutečností vyplývá, že v rostlinné biotechnologii je nezbytné optimální řízení exprese genu a rozdílnost regulačních elementů.

Pro nově vloženou DNA, která se má přepsat, musí být přítomny správné regulační sekvence ve správném místě vzhledem k požadované sekvenci a pak je možné tuto DNA přepsat do proteinu rostlinné buňky. Tyto regulační sekvence zahrnují, avšak nejsou omezeny na promotor, 5' nepřepsanou vedoucí sekvenci a 3' polyadenylační sekvenci. Schopnost výběru tkání, do kterých se má přepsat tato cizí DNA, a schopnost výběru období během růstu rostliny, kdy má dojít k transkripci takové cizí DNA, je také možná pomocí výběru vhodné promotorové sekvence, která kontroluje transkripci těchto genů.

Pro genetické inženýrství rostlin lze využít množství různých druhů nebo tříd promotorů. Promotory mohou být klasifikovány na základě rozsahu specifity nebo tkáňové specifity. Například promotory, nazývané též konstitutivní promotory, jsou schopné účinné transkripce operativně navázaných DNA sekvencí a jsou také schopné exprese těchto DNA sekvencí v několika tkáních. Tkáňově zesílené nebo tkáňově specifické promotory lze nalézt proti směru exprese a také operativně navá-

zané na DNA sekvence běžně přepsaných na vyšších hladinách určitých tkání rostlin nebo je lze nalézt v určitých tkáních rostlin. Jiná třída promotorů zahrnuje, ale není omezena na indukovatelné promotory, kterým lze dát podnět vnějšími podněty, jako jsou chemické prostředky, vývojové podněty nebo podněty prostředí. Tak lze obdržet různé druhy požadovaných promotorů izolací protisměrných 5' regulačních oblastí DNA sekvencí, které jsou transkribovány a přepsány konstitutivním, tkáňově zesíleným nebo indukovatelným způsobem.

Technologické pokroky ve vysoce výkonném sekvenování a bioinformatice poskytly další molekulární nástroje pro objevování promotorů. Konkrétní cílové rostlinné buňky, tkáně nebo orgány za specifického stupně vývoje, nebo za určitých chemických, okolních nebo fyziologických podmínek, lze použít jako zdroj materiálu k izolaci mRNA a konstrukci cDNA knihoven. Knihovny cDNA se rychle sekvenují a přepsané sekvence se elektronicky katalogizují. Za použití software pro analýzu sekvencí lze v krátké době analyzovat tisíce sekvencí a lze porovnat sekvence z vybraných cDNA knihoven. Kombinace laboratorních a počítačových odečítacích metod dovoluje výzkumným pracovníkům skenovat a porovnávat cDNA knihovny a identifikovat sekvence s požadovaným profilem exprese. Například sekvence přepisované preferovaně v jedné tkáni, lze identifikovat porovnáním cDNA knihovny jedné tkáně s cDNA knihovnami jiných tkání a elektronicky "odečíst" běžné sekvence a najít ty sekvence, které se přepisují pouze v požadované tkáni. Tkáňově zesílená sekvence lze poté použít jako sonda nebo primer pro klonování korespondující cDNA o plné délce. Genomická knihovna cílové rostliny lze poté použít k izolaci korespondujícího genu a spojených regulačních elementů, včetně promotorových sekvencí.

Několik promotorových sekvencí, které dodávají potřebný profil exprese, jako jsou promotory schopné regulace exprese operativně navázaných genů v několika tkáních, lze izolovat selektivním porovnáním cDNA knihoven požadovaných cílových tkání s cDNA knihovnami necílových tkání nebo s cDNA knihovnami pozadí. Tak zjistíme 5' regulační oblasti spojené s přepsanými sekvencemi v těchto knihovnách cílů. Izolované promotorové sekvence lze použít pro selektivně modulovanou expresi jakéhokoli operativně navázaného genu a poskytnout tak další rozlišnost regulačních elementů u rostlinného expresivního vektoru v metodách skládání genů.

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje sekvence nukleové kyseliny, které obsahují regulační sekvence umístěné proti směru exprese genu na 5' konci rostlinných DNA strukturálních kódujících sekvencí, které jsou přepsány v několika tkáních našeho zájmu a jsou ukázané v sekvencích SEKV. ID. Č.: 53-75.

V jednom aspektu tento vynález poskytuje sekvence nukleové kyseliny obsahující sekvence vybrané ze skupiny sestávající ze sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo jakýchkoliv fragmentů, oblastí, nebo cis elementů sekvence, které jsou schopné regulace transkripce operativně navázaných DNA sekvencí.

Vynález také poskytuje sekvence nukleové kyseliny obsahující sekvenci vybranou ze skupiny sestávající ze sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75, které jsou promotory.

Jiný aspekt tohoto vynálezu se zabývá použitím alespoň jednoho jejich (SEKV. ID. Č.: 53-75) fragmentu, oblasti nebo cis elementu objevených 5' sekvencí, které mohou být skombinovány a vytvořit tak nové promotory nebo se mohou použít v nové kombinaci s dalšími heterologními regulačními sekvencemi za tvorby hybridního nebo chimérického promotoru, který je schopný modulace transkripce operativně navázané DNA sekvence.

Proto se vynález zabývá použitím sekvencí nukleových kyselin popsanych v SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo jakýmkoliv fragmentem, oblastí nebo cis elementů popsanych sekvencí, které jsou schopné regulace transkripce DNA sekvence, pokud jsou operativně navázané na DNA sekvenci.

Proto vynález neobsahuje pouze sekvence, které jsou v SEKV. ID. Č.: 53-75, ale obsahují také jakékoliv zkrácené nebo deleční deriváty nebo jejich fragmenty nebo oblasti. Tyto jsou schopné nezávisle fungovat jako promotor obsahující cis elementy, které jsou schopné fungovat jako regulační sekvence ve spojení s jednou nebo více regulačními sekvencemi, pokud jsou operativně navázané na přepisovatelnou sekvenci.

Vynález tedy obsahuje nový promotor nebo hybridní, nebo chimérický promotor obsahující nukleovou kyselinu o sekvencích SEKV. ID. Č.: 53-75. Hybridní nebo chimérické promotory mohou sestávat z fragmentů, oblastí nebo cis elementů jakékoliv délky sestavených z popsanych sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75 kombinovaných s jakýmkoliv jiným, transkripčně aktivním promotorem o minimální nebo plné délce. Například promotorová sekvence, vybraná ze sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75,

se může skombinovat s CaMV.35S nebo s jiným promotorem a vytvořit tak nový hybridní promotor. Lze také použít minimální promotor v kombinaci se sekvencemi nukleové kyseliny tohoto vynálezu. Nový promotor také obsahuje jakýkoliv promotor vytvořený inženýringem sekvencí nukleových kyselin popsanych v SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo inženýringem jakéhokoliv fragmentu, oblasti nebo cis elementu popsanych sekvencí tak, aby byl schopný přepisovat operativně navázanou DNA sekvenci.

Další aspekt vynálezu se zabývá schopností promotorových sekvencí ze SEKV. ID. Č.: 53-75, nebo jejich fragmentů, oblastí nebo cis elementů, regulovat transkripci operativně navázaných přepisovatelných sekvencí v několika tkáních. Fragmenty, oblasti nebo cis elementy sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75, které jsou schopné regulace operativně vázaných DNA sekvencí v určitých tkáních, lze izolovat ze popsanych sekvencí nukleové kyseliny SEKV. ID. Č.: 53-75 a lze je použít pro inženýring nových promotorů, které dodávají požadovaný profil exprese.

Vynález také obsahuje DNA konstrukty obsahující popsané sekvence, jak je uvedeno v SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo v jakémkoliv jejich fragmentu, oblasti nebo cis elementu, včetně nových promotorů generovaných za použití popsanych sekvencí nebo jakéhokoliv fragmentu, oblasti nebo cis elementu popsanych sekvencí.

Vynález také obsahuje jakékoliv buňky a transgenní rostliny obsahující DNA popsanou v sekvencích SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo v jakémkoliv jejich fragmentu, oblasti nebo cis elementu.

Vynález také poskytuje způsob regulace transkripce DNA sekvence, včetně operativního navázání DNA sekvence k jakémukoli promotoru obsahujícímu nukleovou kyselinu obsahující všechny, nebo jakýkoliv fragment, oblast nebo cis element sekvence vybrané ze skupiny sestávající ze sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75.

V jiném provedení tento vynález poskytuje způsob regulace exprese DNA sekvencí v několika tkáních pomocí operativního navázání sekvence, která se vybere ze skupiny sestávající ze sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75, jakéhokoliv fragmentu, oblasti nebo cis elementu popsanych sekvencí, na jakoukoliv přepisovatelnou DNA sekvenci. Fragmenty, oblasti nebo cis elementy popsanych promotorů, které jsou ukázané v SEKV. ID. Č.: 53-75, lze zpracovat genetickým inženýrstvím a nezávisle použít v nových kombinacích obsahujících multimery, nebo zkrácené deriváty a nové promotory mohou být operativně navázány na přepisovatelnou DNA sekvenci. Popsané fragmenty, oblasti, nebo cis elementy popsanych sekvencí mohou být eventuálně použity v kombinaci s heterologním promotorem, sestávajícím z minimálního

promotoru schopného tvořit nový hybridní nebo chimérický promotor a tento nový hybridní promotor může být operativně navázán na prepisovatelnou DNA sekvenci.

Vynález také poskytuje způsob tvorby transgenní rostliny, kdy se do rostlinné buňky zavede konstrukt DNA, který obsahuje: (i) promotor obsahující nukleovou kyselinu obsahující sekvenci vybranou ze skupiny sestávající ze sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75, nebo jejich fragmentů, oblastí, nebo cis elementů, které jsou operativně navázány na promotor, (ii) prepisovatelnou DNA sekvenci a (iii) 3' nepřeloženou oblast.

Vynález také poskytuje způsob izolace alespoň jedné 5' regulační sekvence s požadovaným profilem exprese z cílové rostliny, pomocí vyhodnocení knihovny sekvencí nukleových kyselin přepsaných sekvenčních tagů (ESTs) odvozených od jedné nebo více cDNA knihoven připravených z rostlinných buněk našeho zájmu. Porovnají se EST sekvence alespoň jedné cDNA knihovny cílové rostliny s jednou nebo více cDNA knihovnami ESTs necílových rostlin u rozdílných typů rostlinných buněk. Odečtou se běžné EST sekvence, které jsou jak v cílových, tak i necílových knihovnách, ze zbývajících ESTs po odečtení se navrhnou gen-specifické primery, které reprezentují cílové přepsané sekvence a izolují se korespondující 5' lemovací a regulační sekvence, které obsahují promotorové sekvence z genomické knihovny připravené z cílové rostliny za použití gen-specifických primerů.

To, co zde bylo uvedeno, a další aspekty tohoto vynálezu, se lépe ozřejmí následujícím detailním popisem a obrázky.

Tato přihláška si nárokuje U.S. prozatímní přihlášku vynálezu č. 60/154 182 podanou 16.9.1999.

Definice a způsoby

Následující definice a způsoby jsou uvedeny pro přesnější definici následujícího vynálezu a mají za úkol vést lidi běžně pracující v oboru při provádění vynálezu. Pokud není uvedeno jinak, termíny jsou použity podle konvenčního používání u lidí běžně pracujících v oboru. Nomenklatura DNA bází se používá podle 37 CFR § 1,822. Pro zbytky aminokyselin se používá standardní jedno- a třípísmenná nomenklatura.

“Nukleová kyselina (Sekvence nukleové kyseliny)” nebo “polynukleotid (polynukleotidová sekvence)” se vztahuje k jedno- nebo dvouřetězcové DNA nebo RNA genomického nebo syntetického původu, tj. polymer deoxyribonukleotidových nebo ribonukleotidových bází, podle uvedeného pořadí, při čtení od 5' konce (proti směru

exprese genu) k 3' konci (po směru exprese genu). Nukleová kyselina může představovat negativní nebo komplementární (pozitivní) řetězec.

"Nativní" se vztahuje k přirozeně se vyskytující ("standardní") sekvenci nukleové kyseliny.

"Heterologní" sekvence se vztahuje k sekvenci, která pochází z cizího zdroje nebo druhu nebo pokud pochází ze stejného zdroje, pak je tato sekvence modifikována od její původní formy.

"Izolovaná" sekvence nukleové kyseliny je podstatně izolována nebo vyčištěna od jiných sekvencí nukleové kyseliny, se kterými je nukleová kyselina normálně spojena v buňce organismu, kde se přirozeně vyskytuje, tj. od jiné chromosomální nebo mimochromosomální DNA. Termín zahrnuje nukleové kyseliny, které se biochemicky přečistí tak, že se podstatně odstraní kontaminující nukleové kyseliny a další buňčné komponenty. Termín také zahrnuje rekombinantní nukleové kyseliny a chemicky syntetizované nukleové kyseliny.

Termín "podstatně čistý" zde použitý, se vztahuje k molekule separované od v podstatě všech ostatních molekul běžně s ní spojených v normálním stavu. Výhodněji je podstatně čistá molekula převládající molekula přítomná v preparátu. Podstatně čistá molekula by měla být více než ze 60 %, výhodně 75 %, výhodněji více než z 90 % bez dalších molekul (kromě rozpouštědla) přítomných v přirozené směsi. Termín "podstatně čistý" nemá zahrnovat molekuly přítomné v jejich nativním stavu.

První sekvence nukleové kyseliny vyjadřuje "podstatně identitickou" s referenční sekvencí nukleové kyseliny, za podmínky optimálního seřazení (s vhodnými nukleotidovými inzercemi nebo delecemi, kterých je celkově méně než 20 % referenční sekvence v porovnávané oblasti) s jinou nukleovou kyselinou (nebo jejím komplementárním řetězcem), pokud zde je alespoň 75% identita v nukleové sekvenci, výhodně alespoň asi 80% identita, výhodněji alespoň asi 85% identita a nejvýhodněji alespoň asi 90% identita v rozmezí porovnávané oblasti, kde se nachází alespoň 20 nukleotidových pozic, výhodně alespoň 50 nukleotidových pozic, výhodněji alespoň 100 nukleotidových pozic a nejvýhodněji je porovnávaná oblast přes celou délku první nukleové kyseliny. Optimální seřazení sekvencí pro vyrovnání porovnávací oblasti lze provést algoritmem lokální homologie od Smith a Waterman Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; algoritmem lokální homologie od Needleman a Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; metodou hledání podobnosti od Pearson a Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; výhodně počítačovým zpracováním těchto algo-

ritmů (GAP, BESTFIT, FASTA, a TFASTA), které jsou obsaženy v software Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI. Referenční nukleová kyselina může být molekula o celé délce nebo část větší molekuly. Eventuelně mají dvě nukleové kyseliny podstatnou identitu, pokud jedna na druhou hybridizuje za tvrdých podmínek, jak je definováno níže.

První sekvence nukleové kyseliny je "operativně navázána" s druhou sekvencí nukleové kyseliny, pokud jsou sekvence uspořádány tak, že první sekvence nukleové kyseliny ovlivňuje funkci druhé sekvence nukleové kyseliny. Výhodně jsou obě sekvence částí přiléhající molekuly nukleové kyseliny a výhodněji jsou sousedící. Například promotor je operativně navázán ke genu, pokud promotor reguluje nebo zprostředkovává transkripci genu v buňce.

"Rekombinantní" nukleová kyselina se vytvoří umělou kombinací dvou jinak oddělených segmentů sekvence, tj. chemickou syntézou nebo zpracováním izolovaných segmentů nukleových kyselin technikami genetického inženýrství. Techniky pro zpracování nukleových kyselin jsou dobře známé (viz např. Sambrook a kol., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 a Ausubel a kol., 1992).

Způsoby chemické syntézy nukleových kyselin se probírají např. v Beaucage a Carruthers, Tetra. Letts. 22:1859-1862, 1981, a v Matteucci a kol., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981. Chemická syntéza nukleových kyselin lze provádět například na komerčních automatizovaných syntetizérech oligonukleotidů.

"Syntetická sekvence nukleové kyseliny" můžou být určeny a chemicky syntetizovány pro zvýšenou expresi v určitých hostitelských buňkách a pro účely klonování do patřičných vektorů. Hostitelské buňky často vykazují výhodný vzor použití kodonu (Murray a kol., 1989). Syntetické DNA určené ke zvýšení exprese v určitém hostiteli by tedy měly odrážet obrazec použití kodonu v hostitelské buňce. Pro tyto účely jsou dostupné počítačové programy jako jsou např. "BestFit" nebo "Gap" ze Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, Inc., University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, WI 53711.

"Amplifikace" nukleových kyselin nebo "reprodukce nukleové kyseliny" se vztahuje na produkci dalších kopií sekvence nukleové kyseliny a provádí se pomocí technologií polymerázové řetězové reakce (PCR). Je známo a popsáno mnoho amplifikačních metod, mezi jinými v U.S. Patent Nos. 4,683,195 a 4,683,202 a v PCR

Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis a kol., Academic Press, San Diego, 1990. V PCR je primer krátký oligonukleotid o definované sekvenci, který je teplotně hybridizován k DNA matrici, aby zahájil polymerázovou řetězovou reakci.

“Transformovaný”, “transfektovaný” nebo “transgenní” se vztahuje k buňce, tkáni, orgánu nebo organismu, do kterého se zavedla cizí nukleová kyselina, jako je rekombinantní vektor. Výhodně je zavedená nukleová kyselina integrována do genomické DNA recipientní buňky, tkáně, orgánu nebo organismu tak, že se zavedená nukleová kyselina dědí následujícími potomky. “Transgenní” nebo “transformovaná” buňka nebo organismus také obsahuje potomstvo buňky nebo organismu a potomstvo produkované křížením, které využívá při křížení takovou „transgenní“ rostlinu jako rodiče a které vykazuje změněný fenotyp jako výsledek přítomnosti rekombinantního konstruktů nebo vektoru.

Termín “gen” se vztahuje na chromosomální DNA, plasmidovou DNA, cDNA, syntetickou DNA nebo jinou DNA, která kóduje peptid, polypeptid, protein nebo RNA molekulu a vztahuje se na oblasti lemující kódující sekvence zapojené do regulace exprese. Některé geny mohou být přepsány do mRNA a přeloženy do polypeptidů (strukturní geny); jiné geny mohou být přepsány do RNA (např. rRNA, tRNA); a jiné druhy genů fungují jako regulátory exprese (regulační geny).

“Expresce” nebo “přepis” genu se vztahuje na transkripci genu za účelem produkce korespondující mRNA a translaci této mRNA za účelem produkce korespondujícího genového produktu, tj. peptidu, polypeptidu nebo proteinu. Expresce genu se řídí nebo moduluje regulačními elementy včetně 5' regulačních elementů jako promotorů.

“Genetická komponenta” se vztahuje na jakoukoliv sekvenci nukleové kyseliny nebo genetický element, které mohou být také komponentou nebo částí expresivního vektoru. Příklady genetických komponent zahrnují, avšak nejsou omezeny na promotorové oblasti, 5' nepřeložené vedoucí oblasti, introny, geny, 3' nepřeložené oblasti a jiné regulační sekvence nebo sekvence, které ovlivňují transkripci nebo translaci jedné nebo více sekvencí nukleových kyselin.

Termíny „rekombinantní DNA konstrukt“, „rekombinantní vektor“, „expresivní vektor“ nebo „expresivní kazeta“ se vztahují na jakéhokoliv působícího činitele jako je plazmid, kosmid, virus, BAC (bakteriální umělý chromosom), autonomně se replikující sekvence, fág nebo lineární nebo kružnicová jednořetězcová nebo dvouřetězcová DNA nebo RNA nukleotidová sekvence, odvozená od jakéhokoliv zdroje schopného

genomické integrace nebo autonomní replikace obsahující DNA molekulu, ve které byly navázány jedna nebo více DNA sekvencí ve smyslu funkčně operativním.

„Komplementární“ se vztahuje na přírodní spojení sekvencí nukleových kyselin pomocí párování bází (A-G-T páry s komplementární sekvencí T-C-A). Komplementarita mezi dvěma jednořetězcovými molekulami může být částečná, pokud jenom některý z páru nukleových kyselin je komplementární; nebo úplná, pokud všechny páry bází jsou komplementární. Stupeň komplementarity ovlivňuje účinnost a sílu hybridizace a amplifikační reakce.

„Homologie“ se vztahuje na hladinu podobnosti mezi sekvencemi nukleové kyseliny nebo aminokyselinami podle procentuální nukleotidové nebo aminokyselinové poziční identity, tj. podle sekvenční podobnosti nebo identity. Homologie se také vztahuje na koncept podobných funkčních vlastností mezi různými nukleovými kyselinami a proteiny.

„ESTs“ nebo přepsané sekvenční tagy jsou krátké sekvence náhodně vybraných klonů z cDNA (nebo jinak komplementární DNA) knihovny, které reprezentují cDNA inzerty těchto náhodně vybraných klonů (McCombie a kol., Nature Genetics, 1:124, 1992; Kurata a kol., Nature Genetics, 8:365, 1994; Okubo a kol., Nature Genetics, 2:173, 1992).

Termín „elektronický northern“ se vztahuje na počítačově založenou analýzu, která umožňuje elektronicky porovnávat sekvence z několika cDNA knihoven na základě zadaných parametrů, včetně četnosti EST populací v několika cDNA knihovnách, nebo lze najít soubory EST v jedné nebo v kombinaci knihoven.

„Subsetting“ se vztahuje na způsob porovnávání sekvencí nukleových kyselin z různých nebo několika zdrojů, které lze použít pro identifikaci profilu sekvencí nukleových kyselin, který odráží genovou transkripční aktivitu a stabilitu informace v dané tkáni na daném místě nebo za daných podmínek.

„Promotor“ se vztahuje na sekvenci nukleové kyseliny umístěné proti směru exprese genu nebo 5' k translačnímu start kodonu otevřeného úseku čtení (nebo protein kódující oblasti) genu a má za úkol rozpoznat a navázat se na RNA polymerázu II a na jiné proteiny (transkripční faktory působící v poloze trans), čímž zahájí transkripci. „Rostlinný promotor“ je nativní nebo nenativní promotor, který je funkční v rostlinných buňkách. Konstitutivní promotory jsou funkční ve většině nebo ve všech tkáních rostliny během vývoje rostliny. Tkáňově-, orgánově- nebo buněčně-specifické promotory jsou přepsány pouze nebo převážně v konkrétní tkáni, orgánu nebo typu

buňky, podle uvedeného pořadí. Spíše než přepis „specifický“ v dané tkáni, orgánu nebo druhu buňky, může promotor vykazovat přepis „zesílený“, tj. zvýšená úroveň exprese v jedné části (např. druh buňky, tkáň nebo orgán) rostliny v porovnání s jinými částmi rostliny. Dočasně regulované promotory jsou funkční převážně jen v určitých časových periodách vývoje rostliny nebo v určitém čase přes den, jako je například případ genů spojených s cirkadiánními rytmy. Indukovatelné promotory selektivně přepisují operativně navázanou DNA sekvenci, jako odpověď na přítomnost endogenního nebo exogenního stimulu, například chemickými sloučeninami (chemické induktory) nebo jako odpověď na okolní, hormonální, chemické a/nebo vývojové signály. Mezi indukovatelné nebo regulované promotory patří například promotory regulované světlem, teplem, stresem, zavlažením nebo suchem, fytohormony, zraněním nebo chemikáliemi jako je ethanol, jasmonát, kyselina salicylová nebo "safeners".

Jakýkoliv rostlinný promotor se může použít jako 5' regulační sekvence pro modulaci exprese konkrétního genu nebo genů. Jedním výhodným promotorem je promotor rostlinné RNA polymerázy II. Promotory rostlinné RNA polymerázy II, tak jako ostatní vyšší eukaryota, mají komplexní struktury a jsou složeny z několika různých prvků. Jedním takovým prvkem je TATA box nebo Goldberg-Hogness box, který je zapotřebí pro správnou expresi eukaryotických genů *in vitro* a pro přesnou a účinnou iniciaci transkripce *in vivo*. TATA box je obvykle umístěn přibližně na -25 až -35, tj. na 25 až 35 párů bází (pb) protisměru exprese genu (5') od iniciačního místa transkripce nebo od čepičky, kde toto místo je definováno jako pozice +1 (Breathnach a Chambon, *Ann. Rev. Biochem.* 50:349-383, 1981; Messing a kol., In: *Genetic Engineering of Plants*, Kosuge a kol., vydavatelé, str. 211-227, 1983). Další běžný element CCAAT box se nachází mezi -70 a -100 pb. V rostlinách CCAAT box může mít jinou konvenční sekvenci, než funkčně analogická sekvence savčích promotorů (rostlinný analog se nazývá „AGGA box“ pro rozlišení od jeho zvířecího protějšku; Messing a kol., v: *Genetic Engineering of Plants*, Kosuge a kol., vydavatelé, str. 211-227, 1983). Navíc ve skutečnosti všechny promotory obsahují další sekvence nebo zesilovače transkripce, které aktivují protisměrnou expresi genu (Benoist a Chambon, *Nature* 290:304-310, 1981; Gruss a kol., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78:943-947, 1981; a Khoury a Gruss, *Cell* 27:313-314, 1983) a ty se nachází od asi -100 pb do asi -1 000 pb nebo více proti směru exprese od iniciačního místa transkripce.

Při fúzi s heterologními DNA sekvencemi tyto promotory obvykle způsobují, že fúzované sekvence se přepisují způsobem podobným jako genová sekvence, se kterou je promotor běžně spojen. Můžou se také přidat fragmenty promotoru, které obsahují regulační sekvence (například inzertované do, nebo fúzované s 5' koncem aktivního promotoru, který má své částečné nebo kompletní regulační sekvence (Fluhr a kol., Science 232:1106-1112, 1986; Ellis a kol., EMBO J. 6:11-16, 1987; Strittmatter a Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:8986-8990, 1987; Poulen a Chua, Mol. Gen. Genet. 214:16-23, 1988; Comai a kol., Plant Mol. Biol. 15:373-381, 1991). Eventuelně lze přidat heterologní regulační sekvence k 5' oblasti proti směru exprese genu inaktivního zkráceného promotoru, např. promotoru obsahujícího pouze aktivní zóny TATA a občas CCAAT elementů (Fluhr a kol., Science 232:1106-1112, 1986; Strittmatter a Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:8986-8990, 1987; Aryan a kol., Mol. Gen. Genet. 225:65-71, 1991).

Promotory obvykle obsahují vícenásobné jasně označené „transkripční regulační elementy působící v poloze cis“ nebo jednoduše „cis-elementy“, přičemž se zdá, že každý dodává odlišný směr celkovému řízení exprese genu (Strittmatter a Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:8986-8990, 1987; Ellis a kol., EMBO J. 6:11-16, 1987; Benfey a kol., EMBO J. 9:1677-1684, 1990). „Cis elementy“ vážou bílkovinné faktory působící v poloze trans, které regulují transkripci. Některé cis elementy vážou více než jeden faktor a transkripční faktory působící v poloze trans, mohou interagovat s více než jedním cis elementem s různou afinitou (Johnson a McKnight, Ann. Rev. Biochem. 58:799-839, 1989). Rostlinné transkripční faktory, korespondující cis elementy a analýza jejich interakcí se probírá například v: Martin, Curr. Opinions Biotech. 7:130-138, 1996; Kurzi, In: Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology, Dashek, ed., CRC Press. 1997, str. 397-422; a v Methods in Plant Molecular Biology, Maliga a kol., vydavatelé, Cold Spring Harbor Press, 1995, str. 233-300. Promotorové sekvence tohoto vynálezu mohou obsahovat „cis elementy“, které mohou dodávat nebo modulovat expresi genu.

Cis elementy lze identifikovat několika technikami jako je deleční analýza, tj. delecí jednoho nebo více nukleotidů od 5' konce nebo od jádra k promotoru; dalšími technikami jsou analýza DNA vazné bílkoviny za použití DNázové I oligonukleotidové mapy, methylační interference, zkoušky změny elektroforézní mobility, zkoumání genomické oligonukleotidové mapy pomocí PCR zprostředkované ligací a jinými konvenčními metodami; nebo podobností sekvence se známými motivy cis elementu

pomocí konvenčních metod porovnání sekvence. Jemná struktura cis elementu lze studovat mutagenézí (nebo substitucí) jednoho nebo více nukleotidů nebo dalšími konvenčními metodami. Viz, např. *Methods in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Dashek, ed., CRC Press, 1997, str. 397-422; a *Methods in Plant Molecular Biology*, Maliga a kol., vydavatelé, Cold Spring Harbor Press, 1995, str. 233-300.

Cis elementy lze obdržet chemickou syntézou nebo klonováním z promotorů, které takové elementy obsahují a lze je syntetizovat s dalšími lemovacími sekvencemi, které obsahují užitečné místa restričních enzymů, které umožňují subsekvenci manipulaci. V jednom provedení jsou promotory složeny z vícenásobných různých „transkripčních regulačních elementů působících v cis poloze“ nebo jednoduše „cis-elementů“, přičemž se zdá, že každý z nich dodává různý aspekt celkového řízení exprese genu (Strittmatter a Chua, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:8986-8990, 1987; Ellis a kol., *EMBO J.* 6:11-16, 1987; Benfey a kol., *EMBO J.* 9:1677-1684, 1990). Ve výhodném provedení oblasti sekvence obsahující „cis elementy“ sekvencí nukleových kyselin SEKV. ID. Č.: 53-75 se identifikují pomocí počítačových programů určených speciálně pro identifikaci cis elementů nebo domén nebo motivů uvnitř sekvencí.

Vynález obsahuje cis elementy SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo homology cis elementů, u kterých se ví, že ovlivňují regulaci genů vykazující homologii se sekvencemi nukleové kyseliny tohoto vynálezu. Literatura obsahuje několik těchto elementů, jako například ty, které jsou regulovány množstvím faktorů jako je světlo, teplo nebo stres; elementy, které jsou regulované nebo indukované patogeny nebo chemikáliemi a podobně. Takové elementy mohou buď pozitivně, nebo negativně regulovat genovou expresi, v závislosti na podmínkách. Mezi příklady cis elementů patří, ale nejde o limitování výčtu, elementy oxygen responzivní (Cowen a kol., *J. Biol. Chem.* 268(36):26904, 1993), na světlo citlivé regulační elementy (viz např. Bruce a Quail, *Plant Cell* 2(11):1081, 1990, a Bruce a kol., *EMBO J.* 10:3015, 1991), dále sem patří cis elementy responzivní na působení methyl jasmonátu (Beaudoin a Rothstein, *Plant Mol. Biol.* 33:835, 1997), elementy responzivní na salicylovou kyselinu (Strange a kol., *Plant J.* 11:1315, 1997), elementy responzivní na tepelný šok (Pelham a kol., *Trends Genet.* 1:31, 1985), elementy responzivní na zranění a abiotické stresy (Loace a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9230, 1992; Mhiri a kol., *Plant Mol. Biol.* 33:257, 1997), elementy responzivní na nízkou teplotu (Baker a kol., *Plant Mol. Biol.* 24:701, 1994; Jiang a kol., *Plant Mol. Biol.* 30:679, 1996; Nordin a kol., *Plant*

Mol. Biol. 21:641, 1993; Zhou a kol., J. Biol. Chem. 267:23515, 1992); a elementy responzivní na sucho (Yamaguchi a kol., Plant Cell 6:251-264, 1994; Wang a kol., Plant Mol. Biol. 28:605, 1995; Bray E. A. Trends in Plant Science 2:48, 1997).

Vynález tedy zahrnuje fragmenty nebo „cis elementy“ popsanych molekul nukleových kyselin a tyto fragmenty nukleových kyselin mohou obsahovat kteroukoliv oblast popsanych sekvencí. Promotorové oblasti nebo částečné promotorové oblasti vynálezu, jak je ukázáno v SEKV. ID. Č.: 53-75, mohou zahrnovat, avšak nejsou omezeny na jeden nebo více regulačních elementů „cis elementů“ nebo domén, které jsou schopné regulovat transkripci operativně navázaných sekvencí DNA v několika tkáních.

Rostlinné promotory mohou obsahovat promotory produkované manipulací známých promotorů za produkce syntetických, chimérických nebo hybridních promotorů. Takové promotory mohou také kombinovat cis elementy z jednoho nebo více promotorů, například, přidavkem heterologní regulační sekvence k aktivnímu promotoru s jeho vlastními částečnými, nebo kompletními regulačními sekvencemi (Ellis a kol., EMBO J. 6:11-16, 1987; Strittmatter a Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:8986-8990, 1987; Poulen a Chua, Mol. Gen. Genet. 214:16-23, 1988; Comai a kol., Plant Mol. Biol. 15:373-381, 1991). Chimérické promotory byly také vyvinuty přidavkem heterologní regulační sekvence k 5' oblasti proti směru exprese genu inaktivního, zkráceného promotoru, tj. promotoru, který obsahuje jen jádro TATA a případně CCAAT elementy (Fluhr a kol., Science 232:1106-1112, 1986; Strittmatter a Chua, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:8986-8990, 1987; Aryan a kol., Mol. Gen. Genet. 225:65-71, 1991). Schéma, konstrukce a použití chimérických nebo hybridních promotorů obsahujících alespoň jeden cis element SEKV. ID. Č.: 53-75 pro modulaci exprese operativně navázaných sekvencí nukleové kyseliny, jsou také obsaženy v tomto vynálezu.

Promotorové sekvence, fragmenty, oblasti nebo jejich cis elementy sestávající ze sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75 jsou schopné přepisu operativně navázaných DNA sekvencí v několika tkáních a mohou selektivně regulovat expresi genů v těchto tkáních. Pro mnoho agronomických vlastností je žádoucí exprese genu nebo genů v několika tkáních za účelem dodání požadované vlastnosti(i). Dostupnost vhodných promotorů, které regulují transkripci operativně navázaných genů ve vybraných určitých cílových tkáních, je důležitá, protože nemusí být žádoucí exprese v každé tkáni, ale pouze v určitých tkáních. Například pokud někdo chce regulovat škodlivý hmyz,

který je zaměřen na určitou tkáň, byla by v našem zájmu exprese požadovaného genového produktu(ů) v těchto tkáních. Pro toleranci k herbicidům by bylo žádoucí mít promotor, který přepisuje operativně vázané geny způsobem, který dodává toleranci k herbicidům na požadovaných úrovních jak u vegetativních, tak i u reprodukčních tkání. V důsledku toho je důležité mít širokou škálu možných 5' regulačních elementů pro jakoukoli koncepci rostlinné biotechnologie.

Nástup technik zpracování genomu, který zahrnuje molekulární a bioinformační techniky, měl za následek rapidní nárůst sekvenování a analýz velkého množství vzorků DNA ze širokého počtu vytyčených cílů, kam patří nejenom rostlinné druhy se zemědělskou důležitostí. Pro identifikaci sekvencí nukleové kyseliny tohoto vynálezu z databáze nebo knihovny cDNA sekvencí, je potřeba nejdříve vytvořit cDNA knihovny určitých specifických rostlinných tkání. Krátce řečeno, cDNA knihovny se vytvoří z tkání, které jsou sklizeny při určitém stupni vývoje, nebo při určitých podmínkách okolí. Identifikací rozdílně přepsaných genů v rostlinných tkáních při různém stupni vývoje, nebo za různých podmínek, lze identifikovat a izolovat korespondující regulační sekvence těchto genů. Zobrazení přepisu umožňuje identifikaci tkáňově-preferovaných sekvencí, založeném na specifickém zobrazení sekvencí nukleové kyseliny z cDNA knihovny. Pomocí zde použitého zobrazení přepisu, se provádí analýza, která porovnává hojnost výskytu přepsaných genů v jedné nebo více knihovnách. Klony obsažené v cDNA knihovně jsou sekvenovány a sekvence se porovnají se sekvencemi veřejně dostupných databází. Způsoby založené na počítačovém zpracování dovolují výzkumnému pracovníkovi porovnávat sekvence z několika knihoven. Proces umožňuje rychlou identifikaci klonů našeho zájmu v porovnání s konvenčními subtraktivními metodami hybridizace, které odborníci dobře znají.

Za použití konvenčních postupů lze sestavit cDNA knihovny z mRNA (mediátorová RNA) daných tkání nebo organismů za použití poly dT primerů a reversní transkriptázy (Efstratiadis a kol., Cell 7:279, 1976; Higuchi a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 73:3146, 1976; Maniatis a kol., Cell 8:163, 1976; Land a kol., Nucleic Acids Res. 9:2251, 1981; Okayama a kol., Mol. Cell. Biol. 2:161, 1982; Gubler a kol., Gene 25:263, 1983).

Lze využít několik způsobů pro získání konstruktů cDNA o plné délce. Například terminální transferáza může být využita pro přidání homopolymerních konců dC zbytků k volným 3' hydroxylovým skupinám (Land a kol., Nucleic Acids Res. 9:2251,

1981). Tento konec lze poté hybridizovat pomocí poly dG oligo, který může vystupovat jako primer při syntéze druhého řetězce cDNA o plné délce. Okyama a Berg popisují způsob obdržení konstruktů cDNA o plné délce. Tento způsob se zjednodušil použitím syntetických primer-adaptérů, které mají jak homopolymerní konce pro iniciaci syntézy prvního nebo druhého řetězce, tak i restrikční místa pro klonování do plazmidů (Coleclough a kol., *Gene* 34:305, 1985) a také bakteriofágové vektory (Krawinkel a kol., *Nucleic Acids Res.* 14:1913, 1986; a Han a kol., *Nucleic Acids Res.* 15:6304, 1987).

Tyto koncepce lze spojit s dalšími koncepcemi pro izolaci vzácných mRNA populací. Například typická savčí buňka obsahuje mezi 10 000 a 30 000 různých mRNA sekvencí: Davidson, *Gene Activity in Early Development*, 2nd ed., Academic Press, New York, 1976. Množství klonů, které jsou potřeba pro dosažení pravděpodobnosti, že bude mRNA s nízkým výskytem přítomna v cDNA knihovně, je $N = (\ln(1-P))/\ln(1-1/n)$, kde N je počet potřebných klonů, P je požadovaná pravděpodobnost a $1/n$ je část frakce z celkové mRNA, která je reprezentována jednou vzácnou mRNA (Sambrook a kol., 1989).

Jedním způsobem jak obohatit preparáty mRNA o určité sekvence, je frakcionace podle velikostí. Jedním takovým způsobem je frakcionace elektroforézou přes agarózový gel (Pennica a kol., *Nature* 301:214, 1983). Dalším takovým způsobem je odsávací gradientová centrifugace v přítomnosti prostředku, který denaturuje sekundární strukturu RNA, kde tento prostředek může být hydroxid methylnatý (Schweinfest a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 79:4997-5000, 1982).

Často používaným způsobem je sestrojení egalizovaných nebo normalizovaných cDNA knihoven (Ko. *Nucleic Acids Res.* 18:5705, 1990; Patanjali, S. R. a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:1943, 1991). Obvykle je cDNA populace normalizována pomocí subtraktivní hybridizace: Schmid a kol., *J. Neurochem.* 48:307, 1987; Fargnoli a kol., *Anal. Biochem.* 187:364, 1990; Travis a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:1696, 1988; Kato. *Eur. J. Neurosci.* 2:704, 1990; a Schweinfest a kol., *Genet. Anal. Tech. Appl.* 7:64, 1990). Subtrakce reprezentuje další způsob redukce populace určitých sekvencí v cDNA knihovně (Swaroop a kol., *Nucleic Acids Res.* 19:1954, 1991). Normalizované knihovny lze vytvořit pomocí Soarova postupu (Soares a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 91:9228, 1994). Tato metoda je určena pro redukci počáteční 10 000-násobné odchylky od individuálních cDNA frekvencí, za obdržení výskytu o velikosti jednoho řádu, při zachování celkové sekvenční kom-

plexity knihovny. Při normalizačním procesu výrazně klesá převaha cDNA klonů o velkém výskytu, počet klonů se středně velkým výskytem je relativně nezměněn a výskyt klonů s výjimečnými transkripty se výrazně zvýší.

ESTs mohou být sekvenovány několika způsoby. Dva základní způsoby lze použít pro sekvenování DNA, a to způsob terminace řetězce od Sanger a kol., Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.) 74:5463, 1977 a způsob chemické degradace od Maxam a Gilbert, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 74:560, 1977. Automatizace a pokroky v technologii, jako je záměna radioizotopů se sekvenováním založeném na fluorescenci, snížily namáhání DNA sekvence (Craxton, Methods, 2:20, 1991; Ju a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:4347, 1995; Tabor a Richardson, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:6339, 1995). Jsou dostupné automatické sekvenátory od různých firem, například Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, New Jersey (Pharmacia ALF), LI-COR, Inc., Lincoln, Nebraska (LI-COR 4,000) a Millipore, Bedford, Massachusetts (Millipore BaseStation).

Zjistilo se, že ESTs delší než 150 pb jsou užitečné při hledání podobnosti a při mapování: (Adams a kol., Science 252:1651, 1991). EST sekvence mají normálně od 150-450 bází. Toto je délka informace sekvence, která se běžně a spolehlivě generuje při jednorázovém zjišťování sekvence. Obvykle se z cDNA knihovny dostane pouze jednorázově zjištěná sekvence, Adams a kol., Science 252:1651, 1991. Automatické jednorázové sekvenování obvykle má 2-3% četnost chyb nebo nejistotu v určení báze: (Boguski a kol., Nature Genetics. 4:332, 1993).

EST databáze se vytvořily nebo alespoň částečně vytvořily z, například *C. elegans* (McCombie a kol., Nature Genetics 1:124, 1992); databáze lidské jaterní buňky linie HepG2 (Okubo a kol., Nature Genetics 2:173, 1992); RNA lidského mozku (Adams a kol., Science 252:1651, 1991; Adams a kol., Nature 355:632, 1992); *Arabidopsis* (Newman a kol., Plant Physiol. 106:1241, 1994); a rýže (Kurata a kol., Nature Genetics 8:365, 1994). Vynález používá ESTs z několika knihoven připravených z více kukuřičných tkání, jako nástroj pro identifikaci genů přepsaných v určitých tkáních, což poté umožňuje izolaci 5' regulačních sekvencí jako promotorů, které regulují geny.

Počítačové sekvenční analýzy lze použít pro identifikaci různě přepsaných sekvencí, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na sekvence přepsané v jedné tkáni, v porovnání s jinou tkání. Například lze najít jiný soubor sekvencí v cDNA izolovaných z různých rostlinných tkání, jako je kořenová tkáň oproti listové tkáni. Stejně

tak lze porovnávat sekvence z cDNA knihoven připravených z rostlin, které vyrostly za různých podmínek prostředí a za různých fyziologických podmínek. Jakmile se výhodné sekvence identifikují z cDNA určité knihovny, lze izolovat genomické klony z genomické knihovny připravené z tkáně rostliny a lze identifikovat a izolovat příslušné regulační sekvence, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na 5' regulační sekvenci.

V jednom výhodném provedení se katalogizují sekvence přepsaných sekvenčních tagů (EST) z několika druhů cDNA knihoven do databáze sekvencí. Tato databáze se použije pro identifikaci cílů promotoru v určité tkáni. Výběr přepsaných sekvenčních tagů pro následující izolaci promotoru odráží přítomnost jedné nebo více sekvencí mezi typickými ESTs při náhodném vzorkování individuální cDNA knihovny nebo sbírky cDNA knihoven. Například identifikace regulačních sekvencí, které regulují expresi transkriptů v listové a kořenové tkáni, se provádí identifikací ESTs, které se nacházejí v listové a kořenové cDNA knihovně a nenacházejí se, nebo mají nízký výskyt, v dalších cDNA knihovnách a dále se zkoumá profil exprese pro dané EST. Výskytem se zde myslí počet, kolikrát se klon nebo shluk klonů objeví v knihovně. Takto se identifikují sekvence, které jsou zesílené, nebo které mají vyšší výskyt ve specifické tkáni nebo orgánu, což reprezentuje profil exprese v daném cíli. Primery lze poté navrhnout z identifikovaných EST sekvencí. Metodu založenou na PCR lze použít pro amplifikaci lemujících oblastí z genomické knihovny cílové rostliny našeho zájmu. Odborníkům je známo několik způsobů pro amplifikaci neznámých DNA sekvencí sousedících s jádrem oblasti známé sekvence. Způsoby zahrnují, avšak nejsou omezeny na inverzní PCR (IPCR), "vectorette PCR", Y-PCR a "genome walking".

Ve výhodném provedení se genomická DNA navázaná na adaptér podrobí primární PCR amplifikaci s gen-specifickým primerem a primerem, který teplotně hybridizuje na sekvenci adaptéru. PCR produkt je dále použit jako matrice pro vnořený cyklus PCR amplifikace s druhým gen-specifickým primerem a druhým adaptérem. Výsledné fragmenty ze vnořené PCR reakce se poté izolují, přečistí a naklonují do odpovídajícího vektoru. Fragmenty se sekvenují a místa začátku translace lze identifikovat když jsou EST odvozeny od zkrácené cDNA. Fragmenty lze klonovat do rostlinných expresivních vektorů jako transkripční nebo translační fúze s reportérovým genem jako je např. β -glukuronidáza (GUS). Konstrukty lze testovat při krátkodobých analýzách a následně 5' regulační oblasti jsou operativně navázány

na další geny a regulační sekvence našeho zájmu ve vhodném rostlinném transformačním vektoru a transformované rostliny se různými známými způsoby analyzují na expresi genu(ů) našeho zájmu.

Pro identifikaci genů a regulačních sekvencí lze vybrat jakoukoli rostlinu. Příklady vhodných cílových rostlin pro izolaci genů a regulačních sekvencí zahrnují, avšak nejsou omezeny na tyto: Acadia, vojtěška, jablko, meruňka, Arabidopsis, artyčok, roketa setá, chřest obecný, avokádo, banán, ječmen, fazole, řepa, ostružina, borůvka, brokolice, růžičková kapusta, hlávkové zelí, brukev řepka, meloun cukrový, mrkev, maniok jedlý, skočec obecný, květák, celer, třešeň, čekanka obecná, koriandr setý, citroník, mandarinka, jetel, kokos, kávovník arabský, kukuřice, bavlna, okurka, Douglasova jedle, lilek baklažán, čekanka štěrbák, štěrbák zahradní, eukalyptu, feňkl obecný, fíkovník, česnek, dýně, réva, grapefruit, meloun honey dew, jicama, kiwi, hlávkový salát, pórek, citróník, limetta, borovice kadidlová, lněné semeno, mango, melou vodní, houby, nektarinka, vlašský ořech, oves, palmový olej, brukev řepka, ibišek jedlý, olivy, cibule, pomeranč, jakákoliv okrasná rostlina, palma, papája, petržel, pastinák, hrášek, broskev, podzemnice olejná, hruška, paprika, tomel virginický, borovice, ananas, banánovník, švestka, granátové jablko, topol, brambory, dýně, kdouloň obecná, borovice montereyská, ředkev, ředkvička, řepkové semeno, malina, rýže, žito, čirok, sosna dlouhojehlá, sója, špenát, tykev velkoplodá, jahoda, řepa cukrovka, cukrová třtina, slunečnice, sladké brambory, ambroň západní, mandarinka, čaj, tabák, rajče, tritikale, tráva, řepka, réva vinná, vodní meloun, pšenice, konopí, cuketa. Obzvláště výhodnými rostlinami jsou kukuřice, bavlna, sója a pšenice.

Molekuly nukleových kyselin vynálezu jsou izolovány z kukuřice (*Zea mays*). Kukuřičná rostlina vytváří přibližně 20-21 listů, vytváří kukuřičná vlákna asi 65 dnů po emergenci a dospívá asi 125 dnů po emergenci. Běžné rostliny kukuřice se vyvíjí podle obecného vzoru, ale časový interval mezi různými stádii a morfologií je u různých hybridů rozdílný a také závisí na růstových podmínkách a podmínkách vnějšího prostředí.

Existuje několik identifikovatelných stadií ve vývoji kukuřičné rostliny. Stádia jsou definována jako vegetativní (V) a reproduktivní (R) stádia. Další dělení V stadií je označeno numericky jako V1, V2, V3, atd., až do V(n), kde (n) reprezentuje poslední stadium listů před třepením (VT) a první V stadiem je stádium emergence (VE). Například VE je emergence plodolistu z půdy, V1 reprezentuje první pravý list,

V2 reprezentuje druhý list, atd. Mezi reproduktivní stadia patří první výskyt vlákna kvetoucí kukuřice až po dospělé semeno a jsou reprezentovány následovně: R1 je tvorba vláken květu, R2 je tvorba puchýrků, R3 je stadium tvorby mléka, R4 je stadium tvorby těsta, R5 je stadium tvorby zubů a R6 je fyziologická dospělost (viz např. Ritchie SW a kol., (1986) How a Corn Plant Develops, Iowa State University of Science a Technology Kooperative Extension Service, Ames, IA 48: 1-21).

Lze použít jakýkoliv druh rostlinné tkáně jako tkáně cílové pro identifikaci genů a spojených regulačních elementů, které také zahrnují, avšak nejsou omezeny na promotorové sekvence. Pro vynález se použilo více kukuřičných tkání. Výhodněji se použil kukuřičný meristem, nedospělý střepec, list, kořen, stonek, klíčky naklíčené při nedostatku světla, plášť, prvoklíček, ouško, vlákna kvetoucí kukuřice a endosperm jsou cílové tkáně pro identifikaci promotorových sekvencí.

Kterýkoliv způsob, který dovoluje porovnání mezi různými druhy nebo třídami sekvencí, lze použít pro izolaci genů nebo regulačních sekvencí našeho zájmu. Například v jedné metodě diferenčního screeningu, lze cDNA knihovnu z mRNA izolovanou z určité tkáně připravit v bakteriofágovém hostiteli za použití komerčně dostupné sestavy pro klonování. Destičky se rozprostřou na desky obsahující porost bakteriálního hostitele, jako je například *E. coli*, pro vytvoření plaku bakteriofágů. Je možné přenést asi 10⁵-10⁶ destiček na DNA vazebné membrány. Duplikátní membrány se sondují za pomoci sond vytvořených z mRNA z cílové a necílové tkáně nebo tkáně pozadí. Sondy se označí pro usnadnění detekce po hybridizaci a vývoji. Pro další analýzu lze vybrat plaky, které hybridizují se sondami odvozenými od cílové tkáně, ale nelze vybrat ty, které hybridizují se sondami odvozenými od necílové tkáně. Genomické DNA knihovny lze také připravit z vybraných druhů částečným neštěpením pomocí restrikčního enzymu a výběrem velikosti DNA fragmentů v určitém rozsahu délek. Genomická DNA se může naklonovat do vhodného vektoru, jako např. do bakteriofágu a může se připravit za použití vhodné klonovací sestavy jak je již popsáno dříve (viz například Stratagene, La Jolla, CA nebo Vinco BRL, Gaithersburg, MD).

Odborníkům jsou diferenční hybridizační techniky známy a lze je použít pro izolaci požadované třídy sekvencí. Třídami sekvencí se zde myslí sekvence, které lze rozdělit podle běžného pojmenování, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na sekvence izolované z běžné cílové rostliny, běžné knihovny, nebo z druhu tkáně běžné rostliny. Ve výhodném provedení se sekvence našeho zájmu identifikují na základě

sekvenčních analýz a na základě dotazů ze sbírky různých cDNA sekvencí z knihoven různých druhů tkání. Popsaný způsob poskytuje příklad metody diferenčního screeningu založené na elektronické sekvenční analýze rostlinných ESTs odvozených od různých cDNA knihoven.

Mnoho způsobů pro zjištění genové exprese je založeno na měření hladiny mRNA v orgánu, tkáni, nebo ve vzorku buňky. Běžné způsoby zahrnují, avšak nejsou omezeny na RNA přenosy, zkoušky ribonukleázové ochrany a RT-PCR. V jiném výhodném provedení se používá vysoce výkonný způsob, kde se regulační sekvence identifikují metodou profilování transkriptu. Vývoj technologie mikrosouboru cDNA (cDNA microarray technology) umožňuje systematický monitoring profilů exprese genu tisíců genů (Schena a kol., Science, 270:467, 1995). Tato DNA technologie založená na čipu, seřazuje tisíce cDNA sekvencí na nosném povrchu. Tyto soubory se simultánně hybridizují na násobky označených cDNA sond připravených z RNA vzorků z různých druhů buněk nebo tkání, čímž se nám umožní přímo porovnávat expresi. Tato technologie se poprvé demonstrovala při analyzování 48 genů *Arabidopsis* při rozdílné expresi v kořenech a klíčcích (Schena a kol., Science, 270:467, 1995). Nedávno se analyzovaly profily exprese více než 1400 genů za použití cDNA mikrosouborů (Ruan a kol., The Plant Journal 15:821, 1998). Mikrosoubory poskytují vysoce výkonný, kvantitativní a opakovatelný způsob analýzy exprese genu a charakterizace funkce genu. Metoda profilování transkriptu za použití mikrosouborů proto poskytuje další hodnotný nástroj pro izolaci regulačních sekvencí jako promotorů spojených s těmito geny.

Vynález používá vysoce výkonné sekvenční analýzy za účelem vytvoření základů pro rychlou, počítačově založenou identifikaci sekvencí našeho zájmu. Odborníci si jsou vědomi dostupných prostředků pro sekvenční analýzy. Porovnávání sekvencí lze provádět pomocí určení podobnosti testované nebo vyšetřované sekvence, se sekvencemi z veřejně dostupných nebo patentově chráněných databází („analýza podobnosti“) nebo lze sekvence porovnávat vyhledáváním určitých motivů („intrinrická sekvenční analýza“) (např. vyhledávání cis elementů) (Coulson, Trends in Biotechnology, 12:76, 1994; Birren a kol., Genome Analysis, 1:543, 1997).

Nukleotidové sekvence poskytnuté v SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo jejich fragmenty nebo jejich komplementy, nebo nukleotidová sekvence o 90% identitě, výhodně s 95% identitou, ještě výhodněji s 99% identitou nebo 100% identitou se sekvencí poskytnutou v SEKV. ID. Č.: 53-75, nebo jejich fragmenty, nebo jejich

komplementy, mohou být „poskytnuty“ v různých médiích pro ulehčení využití. Takové médium může také poskytnout jejich podskupinu ve formě, která umožní odborníkovi zkoumat sekvence.

V jedné aplikaci tohoto provedení lze nukleotidovou sekvenci vynálezu nahrát na médium, které lze přehrát na počítači. Zde používaný termín „médium, které lze přehrát na počítači“ se vztahuje na jakékoliv médium, které lze přímo číst na počítači, nebo přímo na počítači spustit. Taková média zahrnují, ale nejsou omezeny na magnetická média jako je disketa, pevný disk, paměťové médium a magnetofonová páska; optická paměťová média jako je CD-ROM; elektrická paměťová média jako je RAM a ROM; a smíšená média těchto kategorií jako je magneticko/optická paměťová média. Odborník jistě ocení možnost průmyslové výroby záznamu sekvencí tohoto vynálezu na doposud známé média, s možností čtení na počítači.

Tím, že bude poskytnuta jedna nebo více nukleotidových sekvencí vynálezu, může odborník rutinně získat informaci o sekvenci pro různé účely. Počítačový software je veřejně dostupný, takže odborník může získat informaci o sekvenci pomocí média, které lze přečíst na počítači. Příklady veřejných databází zahrnují, avšak nejsou omezeny na DNA Databáze of Japan (DDBJ) (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>); Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/Genbank/Index.html>); a European Molecular Biology Laboratory Nucleic Acid Sequence Database (EMBL) (http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db.html) nebo jejich verze. Bylo vyvinuto mnoho různých vyhledávacích algoritmů, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na sadu programů pod názvem BLAST. Existuje pět implementací BLASTu, kde tři jsou určeny pro dotazy na nukleotidové sekvence (BLASTN, BLASTX a TBLASTX) a dva jsou určeny pro dotazy na sekvence proteinů (BLASTP a TBLASTN) (Coulson, Trends in Biotechnology, 12:76-80, 1994; Birren a kol., Genome Analysis, 1:543, 1997).

Kterýkoliv program určený pro vyhledávání motivů má také využitelnost pro tento vynález. Programy pro sekvenční analýzu určené pro vyhledávání motivů mohou být využity pro identifikaci cis elementů. Výhodné počítačové programy zahrnují, avšak nejsou omezeny na MEME, SIGNAL SCAN a GENESCAN. Meme je program pro identifikaci konzervovaných motivů (buď nukleových kyselin nebo peptidů) ve skupině neorientovaných sekvencí. Meme ukládá tyto motivy jako soubor profilů. Tyto profily lze použít pro vyhledávání v databázi sekvencí. Algoritmus MEME (verze 2.2) lze najít ve verzi 10.0 v GCG programovém balíku; MEME (T. Bailey a C. Elkan,

Machine Learning, 21(1-2):51-80, 1995 a webovou stránku naleznete na: (<http://www.sdsc.edu/MEME/meme/website/COPYRIGHT.html>). Signal Scan je program, který identifikuje známé motivy v testovaných sekvencích za použití informací z dalších databází motivů (Prestridge, D. S., CABIOS 7, 203-206 (1991)). Informace ze Signal Scan verze 4.0 jsou dostupné na webové stránce: <http://biosci.cbs.umn.edu/software/sigscan.html>. Ftp stránka pro Signal Scan je <ftp://biosci.cbs.umn.edu/software/sigscan.html>. Mezi databáze, které využívá Signal Scan patří PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE> (Higo a kol., Nucleic Acids Research 27(1):297-300 (1999) a TRANSFAC (Heinemeye, X. a kol., Nucleic Acid Research 27(1):318-322), které lze najít na následující webové stránce: <http://transfac.gbf.de/>. GeneScan je další vhodný program pro vyhledávání motivů (Burge, C a Karlin, S. J. Mol. Biol. 268, 78-94 (1997) a informace z verze 1.0 jsou dostupné na následující webové stránce: <http://gnomic.stanford.edu/GENESCANW.html>. Zde používaný termín „cílový strukturní motiv“ nebo „cílový motiv“ se vztahuje k racionálně vybrané sekvenci nebo kombinaci sekvencí, kde se sekvence vybere/vyberou na základě třídímenzionální konfigurace, která se vznikne tvorbou vlásenkové struktury cílového motivu. Existuje několik cílových motivů, které odborníci dobře znají. Proteinové cílové motivy zahrnují, avšak nejsou omezeny na enzymatická aktivní místa a signální sekvence. Výhodné cílové motivy vynálezu zahrnují, avšak nejsou omezeny na promotorové sekvence, cis elementy, vlásenkové struktury a další expresivní elementy, jako jsou sekvence vážící protein.

Zde používaný termín „prostředky pro vyhledávání“ se vztahuje k jednomu nebo k více programům, které jsou implementovány do počítačového systému, pro porovnávání cílové sekvence nebo cílového strukturního motivu s informací o sekvenci, která je uložena na paměťovém médiu. Prostředky pro vyhledávání se využívají pro identifikaci fragmentů nebo oblastí sekvencí tohoto vynálezu, které se shodují s určitou cílovou sekvencí nebo cílovým motivem. Také lze porovnávat několik sekvencí za účelem identifikace obecných oblastí nebo motivů, které mohou být zodpovědné za specifické funkce. Například lze identifikovat cis elementy nebo domény sekvencí, které dodávají specifický profil exprese, pokud se několik promotorových oblastí podobných tříd promotorů zarovná a analyzuje pomocí určitých softwarových balíků.

Vynález dále poskytuje systémy, konkrétně počítačové systémy, které obsahují zde popsanou informaci o sekvenci. Zde používaný termín „počítačový systém“ se vztahuje na hardwareové prostředky, softwareové prostředky a paměťové prostředky využívané k analýze informací o nukleotidových sekvencích tohoto vynálezu. Mezi minimální hardwareové prostředky patří počítačové systémy vynálezu patří procesor (CPU), prostředky pro vstup, prostředky pro výstup a paměťové prostředky. Odborník jistě ocení, že pro vynález je vhodný jakýkoli počítačový systém.

SEKV. ID. Č.: 6-52 jsou primery navrhnuté z cDNA sekvencí identifikovaných pomocí počítačového porovnání sekvencí. Tyto sekvence se používají pro rozšíření sekvence nukleové kyseliny pomocí amplifikační techniky polymerázové řetězové reakce (PCR) (viz např. Mullis a kol., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263, 1986; Erlich a kol., European Patent Appln. 50,424; European Patent Appln. 84,796, European Patent Appln. 258,017, European Patent Appln. 237,362; Mullis, European Patent Appln. 201,184; Mullis a kol., U. S. Patent č. 4,683,202; Erlich, U. S. Patent 4,582,788; a Saiki a kol., U. S. Patent č. 4,683,194). Odborníkům je známo několik PCR amplifikačních způsobů a tyto se používají pro identifikaci sekvencí nukleové kyseliny sousedící se známými sekvencemi. Například byly popsány způsoby inverzní PCR (IPCR) amplifikace pro amplifikaci neznámých DNA sekvencí sousedících s oblastí jádra známé sekvence. Jsou známy také jiné metody jako je zachytová PCR (capture PCR) (Lagerstrom M. a kol., PCR Methods Applic. 1:111, 1991) a "walking PCR" (Parker, JD a kol., Nucleic Acids Res 19:3055, 1991). Existuje několik výrobců, kteří vyrábí sady založené na modifikaci těchto způsobů pro účely identifikace sekvencí našeho zájmu. Technické pokroky včetně vylepšení designu primerů a adaptérů, vylepšení schopností polymerázového enzymu a thermocykléru umožnily rychlejší a účinnější způsoby pro izolaci sekvencí našeho zájmu.

Ve výhodném provedení jsou lemující sekvence obsahující 5' regulační elementy tohoto vynálezu izolovány pomocí metody genome-walking (Universal GenomeWalker™ Kit, CLONTECH Laboratories, Inc., Palo, Alto, CA). Ve stručnosti se přečištěná genomická DNA vystaví působení štěpu restrikčního enzymu, čímž se produkují genomické DNA fragmenty, jejichž konce se naváží na GenomeWalker™ adaptéry. GenomeWalker™ primery se použijí spolu s gen specifickými primery při dvou po sobě následujících PCR reakcích (primární a vnořená PCR reakce), ke tvorbě PCR produktů obsahujících 5' regulační sekvence, které se následně klonují a sekvenují.

Kromě jejich využití při modulaci genové exprese, mají promotorové sekvence tohoto vynálezu také využití jako sondy nebo primery při experimentech hybridizace nukleových kyselin. Sondy a primery nukleových kyselin vynálezu mohou hybridizovat za tvrdých podmínek na cílovou DNA sekvenci. Termín „tvrdé hybridizační podmínky“ jsou definovány jako podmínky, při kterých sonda nebo primer specificky hybridizuje s cílovou sekvencí (sekvencemi) a ne s jinými necílovými sekvencemi, přičemž to lze empiricky určit. Termín „tvrdé podmínky“ je funkčně definován s ohledem na hybridizaci sondy nukleové kyseliny na cílovou nukleovou kyselinu (tj. na konkrétní sekvenci nukleové kyseliny našeho zájmu), specifickým hybridizačním postupem, který se probírá v Sambrook a kol., 1989, v kapitolách 9.52-9.55. Viz také Sambrook a kol., 1989 v kapitolách 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa, Nucl. Acids Res. 12:203-213, 1984; a Wetmur a Davidson, J. Mol. Biol. 31:349-370, 1968. Takovými vhodnými tvrdými podmínkami, které podporují DNA hybridizaci je např. lázeň 6,0 x chlorid sodný/citrát sodný (SSC) při asi 45 °C, s následným promytím 2,0 x SSC při 50 °C. Odborníci tyto podmínky znají, nebo je lze najít v Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6. Například koncentrace soli v promývacím kroku lze vybrat od mírných podmínek od asi 2,0 x SSC při 50 °C, do tvrdých podmínek od asi 0,2 x SSC při 50 °C. Navíc lze teplotu při promývacím kroku zvýšit z mírných podmínek při teplotě místnosti okolo 22 °C, až po tvrdé podmínky při asi 65 °C. Lze měnit jak teplotu, tak i sůl, nebo buď teplota, nebo koncentrace se udržuje na stálé hodnotě při změně hodnot druhé proměnné.

Například hybridizace za použití DNA nebo RNA sond nebo primerů lze provádět při 65 °C v 6x SSC, 0,5% SDS, 5x Denhardtův roztok, 100 µg/ml nespecifické DNA (např. ultrazvukem opracovaná DNA ze spermatu lososa) a s promytím 0,5x SSC, 0,5% SDS při 65 °C pro tvrdé podmínky.

Uvažuje se, že hybridizace za mírných podmínek, jako je nižší hybridizace a/nebo teploty při promývání, lze použít pro identifikaci spřažených sekvencí s nižším stupněm sekvenční podobnosti, pokud se zachová specifita vazebnosti sondy nebo primeru k cílové sekvenci (sekvencím). Proto tedy lze nukleové sekvence vynálezu využít pro jejich schopnost selektivně tvořit dvojité molekuly s komplementárními úseky DNA fragmentů. Detekce DNA segmentů pomocí hybridizace odborníci dobře znají a proto záleží na zamýšlené aplikaci, kde lze zapojit různé hybridizační pod-

mínky, za účelem obdržení různých stupňů selektivity sondy k cílové sekvenci a vybraný způsob bude záviset na požadovaných výsledcích.

Sekvence nukleových kyselin SEKV. ID. Č.: 53-75 a jakékoliv jejich varianty jsou schopné hybridizace na jiné sekvence nukleových kyselin za vhodně vybraných podmínek o různé tvrdosti. Zde uvažované dvě nukleové kyseliny jsou schopné specificky hybridizovat jedna na druhou, pokud tyto dvě molekuly jsou schopné tvorby antiparalelní, dvouřetězcové struktury nukleové kyseliny. Molekula nukleové kyseliny se nazývá „komplementární“ k jiné molekule nukleové kyseliny, pokud vykazuje celkovou komplementaritu. Molekuly vykazují „celkovou komplementaritu“, pokud každý nukleotid každé z molekul je komplementární k nukleotidu té druhé kyseliny. Dvě molekuly se nazývají „minimálně komplementární“, pokud mohou jedna na druhou hybridizovat s dostatečnou stabilitou, která jim dovolí zůstat teplotně hybridizované jedna na druhou při alespoň konvenčně „mírných“ podmínkách. Obdobně, molekuly se nazývají „komplementární“, pokud mohou jedna na druhou hybridizovat s dostatečnou stabilitou, která jim dovolí zůstat teplotně hybridizované jedna na druhou za konvenčně „tvrdých“ podmínek. Konvenční tvrdé podmínky jsou popsány v Sambrook a kol., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, a v Haymes a kol., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, DC, 1985.

Ve výhodném provedení lze sekvence nukleových kyselin SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo fragment, oblast, cis element nebo oligomer jakýchkoliv těchto sekvencí použít při hybridizačních stanoveních jiných rostlinných tkání pro identifikaci blízce příbuzných nebo homologních genů a sdružených regulačních sekvencí. To zahrnuje, avšak není omezeno na stanovení Southernovou nebo northernovou hybridizací na jakýchkoliv substrátech, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na vhodně připravenou rostlinnou tkáň, celulózu, nylon nebo kombinovaný filtr, čip nebo skleněnou desičku. Takovéto postupy jsou v oboru dobře známy a jsou dostupné v sadách nebo v přípravcích, které se komerčně prodávají.

Fragmenty lze samozřejmě obdržet i jinými technikami, jako je přímá syntéza fragmentů chemickou cestou, což se běžně provádí na automatizovaném syntetizéru oligonukleotidů. Fragmenty lze také obdržet použitím technologie reprodukce nukleových kyselin, jako je technologie PCRTM (polymerázová řetězová reakce) pomocí technik rekombinantní DNA obecně známé v oboru molekulární biologie. S ohledem na amplifikaci cílové sekvence nukleové kyseliny (např. pomocí PCR) za použití kon-

krétního amplifikačního páru primerů, se „tvrdé PCR podmínky“ vztahují na podmínky, které dovolují páru primerů hybridizovat pouze na cílovou sekvenci nukleové kyseliny. K této sekvenci se váže primer s korespondující normální sekvencí (nebo s jejím komplementem) a výhodně tvoří jednoznačný amplifikační produkt.

Fragment nukleové kyseliny se zde vztahuje k jakékoliv části nukleové kyseliny, která nemá celou délku. Například v tomto vynálezu se jakákoliv nukleotidová sekvence, která je kratší než je plná délka sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75, považuje za fragment. Fragment také může obsahovat alespoň minimální délku schopnou specificky hybridizovat s normální nukleovou kyselinou za tvrdých podmínek hybridizace, jak je definováno výše. Délka takového minimálního fragmentu je výhodně alespoň osm nukleotidů, výhodněji 15 nukleotidů, ještě výhodněji alespoň 20 nukleotidů a nejvýhodněji alespoň 30 nukleotidů normální sekvence nukleové kyseliny.

Sekvence nukleových kyselin tohoto vynálezu lze také použít jako sondy a primery. Sondy a primery nukleových kyselin lze připravit na základě normální genové sekvence. „Sonda“ je izolovaná nukleová kyselina, ke které je připojena konvenční detekovatelná značka nebo reporter molekula, např. radioaktivní izotop, ligand, chemiluminiscenční prostředek nebo enzym. „Primery“ jsou izolované nukleové kyseliny, které jsou tepelně hybridizovány na komplementární cílový DNA řetězec pomocí hybridizace nukleové kyseliny. Vytvoří se hybrid mezi primerem a cílovým DNA řetězcem a poté se prodlouží podél cílového DNA řetězce pomocí polymerázy, např. DNA polymerázy. Primerové páry lze použít pro amplifikaci sekvence nukleové kyseliny, např. pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo jinými konvenčními způsoby amplifikace nukleové kyseliny.

Sondy a primery mají obecně 15 nebo více nukleotidů, výhodně 20 nebo více nukleotidů, výhodněji 25 nukleotidů a nejvýhodněji 30 nukleotidů nebo více. Takové sondy a primery specificky hybridizují na cílovou DNA nebo RNA sekvenci za tvrdých podmínek hybridizace a specificky hybridizují na cílovou normální sekvenci jiného druhu za mírných podmínek. Výhodně mají sondy a primery podle vynálezu celkovou podobnost s normální sekvencí, ačkoliv jsou sondy od normální sekvence rozdílné a toho, že si zachovávají schopnost hybridizovat na cílové normální sekvence lze dosáhnout konvenčními způsoby. Způsoby přípravy a používání sond a primerů jsou popsány například v *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook a kol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (dále jen „Sambrook a kol., 1989“); *Current Protocols in Molecular Biology*, ed.

Ausubel a kol., Greene Publishing a Wiley-Interscience, New York, 1992 (s periodickou aktualizací) (dále jen „Ausubel a kol., 1992“); a Innis a kol., PCR Protocols: A Guide to Methods a Applications, Academic Press: San Diego, 1990. PCR-primerové páry lze odvodit od známé sekvence, například použitím počítačových programů k tomu určených jako je Primer (verze 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). Primery a sondy založené na zde popsaných normálních promotorových sekvencích, lze použít pro potvrzení a, v případě nutnosti, pro modifikaci popsaných sekvencí konvenčními způsoby, např. pomocí reklonování a resekvenování.

V dalším provedení mohou být zde popsané nukleotidové sekvence promotorů modifikované. Odborníci mohou vytvořit DNA molekuly s variacemi v nukleotidové sekvenci. Nukleotidové sekvence vynálezu, jak jsou ukázány v SEKV. ID. Č.: 53-75, mohou být modifikovány nebo změněny pro zesílení jejich řídicích vlastností. Jedním výhodným způsobem pro změnu sekvence nukleové kyseliny je použití PCR k modifikaci vybraných nukleotidů nebo oblastí sekvencí. Tyto způsoby odborníci dobře znají. Sekvence lze například modifikovat pomocí inserce, delece nebo nahrazení matricových sekvencí při DNA modifikační metodě založené na PCR. „Variantní“ DNA molekuly jsou DNA molekuly obsahující změny, kde jeden nebo více nukleotidů normální sekvence je deletován, přidán a/nebo nahrazen, výhodně při podstatném zachování promotorové funkce. V případě promotorového fragmentu může „variantní“ DNA obsahovat změny ovlivňující transkripci minimálního promotoru, ke kterému je operativně navázána. Variantní DNA molekuly lze například produkovat standardními technikami DNA mutagenese nebo pomocí chemické syntézy variantní DNA molekuly nebo jejich částí.

V jiném provedení nukleotidové sekvence, jak jsou ukázány v SEKV. ID. Č.: 53-75, obsahují tyto nukleotidové sekvence o jakékoliv délce, které jsou schopné regulace operativně navázaných DNA sekvencí. Například sekvence jak jsou popsány v SEKV. ID. Č.: 53-75, mohou být zkrácené nebo deleční části a stále mohou být schopné regulace transkripce operativně navázané DNA sekvence. V jednom souvisejícím provedení může cis element popsaných sekvencí dodávat konkrétní specifitu, jako je dodávání zesílené exprese operativně navázaných DNA sekvencí v určitých tkáních a proto je také schopen regulace transkripce operativně navázaných DNA sekvencí. Následně mohou být jakékoliv fragmenty, části nebo oblasti sekvencí popsaných v SEKV. ID. Č.: 53-75 použity jako regulační sekvence, které

také zahrnují, avšak nejsou omezeny na cis elementy nebo motivy popsaných sekvencí. Například jeden nebo více párů bází může být deletován od 5' nebo 3' konce promotorové sekvence za produkce „zkráceného“ promotoru. Také se může jeden nebo více párů bází inzerovat, deletovat nebo nahradit uvnitř promotorové sekvence. Promotory lze konstruovat tak, že promotorové fragmenty nebo elementy jsou operativně navázány například umístěním takového fragmentu proti směru exprese genu na minimálním promotoru. Minimální nebo bazální promotor je část DNA, která je schopná obnovení a vázání bazálního transkripčního mechanismu. Příkladem bazálního transkripčního mechanismu v eukaryotických buňkách je komplex RNA polymerázy II a jeho pomocné proteiny. Enzymatické komponenty bazálního transkripčního mechanismu jsou schopné iniciace a elongace transkripce daného genu, za použití minimálního nebo bazálního promotoru. To znamená, že zde nebyly zapojeny sekvence působící v cis poloze promotorové oblasti, které jsou schopné obnovení a vázání transkripčních faktorů, které modulují transkripci, např. ji zesilují, potlačují, provádějí transkripci závislou na hormonech, atd. Pro dosažení cílové konstrukce lze provést substituce, delece, inserce nebo jakákoliv jejich kombinace.

Normální nebo syntetické nukleové kyseliny podle vynálezu lze zapojit do konstrukcí rekombinantních nukleových kyselin, obvykle do konstrukcí DNA, schopných zavedení a replikace v hostitelské buňce. V jednom výhodném provedení jsou nukleotidové sekvence vynálezu, jak jsou ukázány v SEKV. ID. Č.: 53-75, nebo jejich fragmenty, varianty nebo deriváty, zapojeny do kazety expresivního vektoru, která obsahuje promotorové oblasti vynálezu operativně navázané na genetickou komponentu, jako je značkovací gen s možností selekce, screeningu nebo rýhovatelny značkovací gen. Popsané sekvence nukleové kyseliny vynálezu jsou výhodně operativně navázány na genetickou komponentu, jako je nukleová kyselina, která dodává požadované vlastnosti spojené s rostlinnou morfologií, fyziologií, růstem a vývojem, úrodností, zvýšením nutričních hodnot, odolností proti chorobám nebo škůdcům, nebo environmentální nebo chemickou tolerancí. Tyto genetické komponenty, jako jsou marker geny nebo agronomické geny našeho zájmu mohou fungovat při identifikaci transformované rostlinné buňky nebo rostliny, nebo mohou vytvářet produkt agronomického užitku.

Ve výhodném provedení jedna genetická komponenta vytváří produkt, který slouží jako prostředek pro selekci a vytváří v regenerovatelné rostlinné tkáni sloučeninu, která dodává rostlinné tkáni odolnost na jinak toxickou sloučeninu. Tyto geny

pro použití jako selektivní, skrínigovatelné nebo rýhovatelne značkovací geny zahrnují, avšak nejsou omezeny na kódující sekvence pro -glukuronidázu (GUS), kódující sekvence pro zeleně fluoreskující protein (GFP), kódující sekvence pro luciferázu (LUX), geny s antibiotickou nebo herbicidní tolerancí. Mezi příklady transpozónů a přidružených genů rezistentních na antibiotika patří transpozóny Tns (bla), Tn5 (nptII), Tn7 (dhfr), peniciliny, kanamycin (a neomycin, G418, bleomycin); metotrexát (a trimetoprim); chloramfenikol; kanamycin a tetracyklin.

Užitečné charakteristiky pro selektivní markery v rostlinách byly nastíněny ve zprávě o využití mikroorganismů (Advisory Committee on Novel Foods and Processes, July 1994). Tato zpráva obsahuje přísný výběr s minimálním počtem netransformovaných tkání, velkým počtem nezávislých transformačních jevů, které nemají významnou interferenci s regenerací, obsahuje aplikace na velké množství druhů a poskytuje metodu zkoumající tkáň na přítomnost markeru.

V oboru je známo několik selektivních marker genů a různé markery rezistentní na antibiotika těmito kritériím vyhovují, patří sem také ty, které jsou rezistentní na kanamycin (nptII), hygromycin B (aph IV) a gentamycin (aac3 a aacC4). Mezi užitečné dominantní selektivní marker geny patří geny kódující geny rezistentní na antibiotika (např. rezistentní na hygromycin, kanamycin, bleomycin, G418, streptomycin nebo spektinomycin); a geny rezistentní na herbicidy (např. fosfinotricin acetyltransferáza). Užitečný postup pro výběr transformantů pro rezistenci na herbicidy je popsán např. ve Vasil, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vols. I-III, Laboratory Procedures and Their Applications, Academic Press, New York, 1984. Mezi jedny konkrétní výhodné selektivní marker geny pro využití ve vynálezu patří geny, které dodávají rezistenci na sloučeniny, jako jsou antibiotika jako kanamycin a na herbicidy jako glyfosát (Della-Cioppa a kol., Bio/Technology 5(6), 1987, U. S. Patent 5,463,175, U. S. Patent 5,633,435). Mohou být zapojeny další prostředky selekce a ty také spadají do rozsahu vynálezu.

Pro praktické provedení vynálezu se použijí konvenční kompozice a způsoby pro přípravu a použití vektorů a hostitelských buněk, podle mj. Sambrook a kol., 1989). Ve výhodném provedení je hostitelskou buňkou buňka rostlinná. Bylo popsáno několik vhodných vektorů pro stálou transfekci rostlinných buněk nebo pro vytvoření transgenních rostlin např. v Pouwels a kol., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, supp. 1987); Weissbach a Weissbach, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, 1989; Gelvin a kol., Plant Molecular Biology Manual,

Kluwer Academic Publishers, 1990; a R. R. D. Croy, Plant Molecular Biology LabFax, BIOS Scientific Publishers, 1993. Mezi rostlinné expresivní vektory může patřit například jeden nebo více klonovaných rostlinných genů transkripčně řízených 5' a 3' regulačními sekvencemi. Mohou také obsahovat selektivní marker umožňující selekci hostitelských buněk obsahujících expresivní vektor. Takové rostlinné expresivní vektory také obvykle obsahují promotorovou regulační oblast (např. regulační oblast řídící indukovatelnou nebo konstitutivní, enviromentálně nebo vývojově řízenou, nebo buněčně- nebo tkáňově-specifickou expresi), místo iniciace transkripce, místo vážící ribozom, signál posttranskripční úpravy, místo terminace transkripce a polyadenylační signál. Jsou zde také obsaženy další sekvence bakteriálního původu, které umožňují klonování vektoru do bakteriálního hostitele. Vektor obvykle obsahuje širokou škálu hostitelů s replikací prokaryotického původu. V jednom konkrétním výhodném provedení je hostitelskou buňkou rostlinná a rostlinný expresivní vektor obsahuje promotorovou oblast, jak je popsáno v SEKV. ID. Č.: 53-75, operativně navázanou sekvenci schopnou transkripce a sekvenci terminující transkripci. Mohou sem patřit také další regulační sekvence, jako 5' nepřeložené vedoucí sekvence, vedle míst restriktáz pro účely klonování.

Je použitelných několik promotorů pro rostlinnou genovou expresi jakéhokoliv genu, který nás zajímá, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na selektivní markery, rýhovatlené značkovače, geny pro toleranci na škůdce, toleranci na nemoci, zvýšení nutričních hodnot a jakékoliv další agronomicky významné geny. Příklady konstitutivních promotorů užitečných pro genovou expresi v rostlině zahrnují, avšak nejsou omezeny na promotor květákovitého mozaikovitého viru (CaMV) 35S, který dodává konstitutivní expresi vysoké úrovně ve většině rostlinných tkáních (viz např. Odel a kol., *Nature* 313:810, 1985), včetně jednoděložných rostlin (viz např. Dekeyser a kol., *Plant Cell* 2:591, 1990; Terada a Shimamoto, *Mol. Gen. Genet.* 220:389, 1990); patří sem nopalín syntázový promotor (An a kol., *Plant Physiol.* 88:547, 1988) a oktopín syntázový promotor (Fromm a kol., *Plant Cell* 1:977, 1989) a promotor krtičníkovitého mozaikovitého viru (FMV).

Mnoho různých rostlinných promotorů genů, které jsou regulovány v důsledku odpovědi na enviromentální, hormonální, chemické a/nebo vývojové signály, lze použít pro expresi operativně navázaného genu v rostlinných buňkách, včetně promotorů regulovaných (1) teplem (Callis a kol., *Plant Physiol.* 88:965, 1988), (2) světlem (např. promotor *rbcS-3A* hrášku, Kuhlemeier a kol., *Plant Cell* 1:471, 1989; kukuřičný

RbcS promotor, Schaffner a Sheen, *Plant Cell* 3:997, 1991; nebo promotor proteinu vázícího chlorofyl a/b, Simpson a kol., *EMBO J.* 4:2723, 1985), (3) promotorů regulovaných hormony, jako je kyselina abscisová (Marcotte a kol., *Plant Cell* 1:969, 1989), (4) zraněním (např. wunI, Siebertz a kol., *Plant Cell* 1:961, 1989); nebo (5) chemikáliemi jako je metyl jasmonát, kyselina salicylová nebo Safener. Může být také výhodné zapojit (6) orgán-specifické promotory (např. Roshal a kol., *EMBO J.* 6:1155, 1987; Schernthaner a kol., *EMBO J.* 7:1249, 1988; Bustos a kol., *Plant Cell* 1:839, 1989).

Promotory vynálezu jsou rostlinné promotory, které jsou schopné přepisovat operativně vázané DNA sekvence v několika tkáních a mohou být operativně navázány na jakýkoliv gen našeho zájmu v expresivním vektoru.

Mezi rostlinné expresivní vektory může patřit signály RNA posttranskripční úpravy, např. introny, které mohou být umístěné proti, nebo po směru exprese v polypeptid-kódující sekvenci v transgenu. Navíc expresivní vektory mohou obsahovat další regulační sekvence od 3'-nepřeložené oblasti rostlinných genů (Thornburg a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:744 (1987); An a kol., *Plant Cell* 1:115 (1989)), např. 3' terminační oblast pro zvýšení mRNA stability mRNA, jako je PI-II terminační oblast brambor nebo oktopin nebo nopalín syntázy 3' terminační oblasti. 5' nepřeložené oblasti mRNA mohou hrát významnou roli při iniciaci translace a mohou být také genetickými komponentami v rostlinném expresivním vektoru. Například na nepřeložených 5' vedoucích sekvencích odvozených od genů proteinů teplotního šoku bylo demonstrováno, že zvyšují expresi genů v rostlinách (viz například U. S. Patent 5,362,865, který je uveden v celé délce pomocí odkazu). Tyto další regulační sekvence proti směru a po směru exprese mohou být odvozeny od zdroje, který je normální nebo heterologní pokud jde o další elementy přítomné na expresivním vektoru.

Promotorové sekvence vynálezu jsou využity pro řízení genové exprese v rostlinných buňkách. Popsané promotorové sekvence jsou genetické komponenty, které tvoří části vektorů využité při transformaci rostlin. Promotorové sekvence vynálezu mohou být použity s jakýmkoliv vhodným rostlinným transformačním plazmidem nebo vektorem obsahující marker s možností selekce nebo screeningu a přidružené regulační elementy, tak jak je popsáno, spolu s jednou nebo více nukleovými kyselinami přepsanými způsobem dostatečným pro dodání konkrétní požadované vlastnosti. Příklady vhodných strukturních genů agronomického významu podle vynálezu mohou zahrnovat, avšak nejsou omezeny na jeden nebo více genů

pro toleranci na hmyz, jako je *Bacillus thuringiensis*., geny pro toleranci na škůdce, jako jsou geny pro kontrolu houbových chorob, geny pro toleranci na herbicidy, jako jsou geny dodávající glyfosátovou toleranci a geny pro kvalitativní vylepšení jako je úrodnost, zvýšení nutričních hodnot, enviromentální tolerance nebo tolerance na stres nebo jakékoliv žádoucí změny v rostlinné fyziologii, růstu, vývoji, morfologii nebo rostlinným produktům. Mezi konkrétní výhodné geny patří jakýkoliv gen s tolerancí na herbicidy, který dodává toleranci na herbicid glyfosát. Tyto geny mohou zahrnovat, avšak nejsou omezeny na AGRTU.aroA:CP4 a GOX geny, jak jsou popsány v U. S. Patent č. 5,463,175, který je zde zahrnut odkazem, a v U. S. Patent č. 5,633,435, který je zde zahrnut odkazem.

DNA kódující sekvence mohou eventuelně ovlivnit tyto fenotypy kódováním nepřeložitelné RNA molekuly, která způsobuje cílenou inhibici exprese endogenního genu, například přes antimediatorové nebo kosupresorové mechanismy (viz např. Bird a kol., Biotech. Gen. Engin. Rev. 9:207, 1991). RNA může také být katalytická RNA molekula (tj. ribozom) zpracovaná genetickým inženýrstvím pro štěpení požadovaného endogenního mRNA produktu (viz například Gibson a Shillito, Mol. Biotech. 7:125, 1997). Proto jakýkoliv gen, který produkuje protein nebo mRNA, která přepisuje požadovanou změnu fenotypu nebo morfologie, je využitelný pro praktickou část vynálezu.

Kromě regulačních elementů nebo sekvencí umístěných proti směru exprese (5') nebo umístěných v DNA sekvenci, existují zde (3') sekvence po směru exprese, které ovlivňují expresi genu. Proto zde použitý termín regulační sekvence, se vztahuje na jakoukoliv sekvenci umístěnou od DNA proti směru exprese, po směru exprese nebo uvnitř DNA sekvence, která řídí, zprostředkovává nebo ovlivňuje expresi genového produktu ve spojení s proteiny syntetizujícím aparátem buňky.

Promotorové sekvence vynálezu mohou být modifikované například pro expresi v jiných rostlinných systémech. V jiném pojetí mohou být nové hybridní promotory navrhnuty nebo vytvořeny různými způsoby. Mnoho promotorů obsahuje protisměrné sekvence, které aktivují, zesilují nebo vymezují sílu a/nebo specifitu promotoru (Atchinson, Ann. Rev. Cell Biol. 4:127, 1988). T-DNA geny například obsahují „TATA“ boxy, které definují místo iniciace transkripce a další protisměrné elementy umístěné proti směru od místa iniciace transkripce modulují transkripční hladiny (Gelvin, In Transgenic Plants (Kung, S.-D. And Us, R., eds), San Diego: Academic Press, str. 49-87, 1988). Další chimérický promotor zkomboval trimer

oktopin syntáza (ocs) aktivátor na mannopin syntáza (mas) aktivátor plus promotor a vykazoval zvýšenou expresi reporter genu (Min Ni a kol., *The Plant Journal* 7:661, 1995). Protisměrné regulační sekvence vynálezu mohou být použity pro konstrukci takových chimérických nebo hybridních promotorů. Způsoby konstrukce variantních promotorů vynálezu zahrnují, avšak nejsou zahrnuty na křížení řídicích elementů různých promotorů nebo duplikace částí nebo oblastí promotoru (viz například U. S. Patent 5,110,732, který je zahrnut odkazem a U. S. Patent 5,097,025, který je zde zahrnut odkazem). Odborníci jistě mají zkušenosti se standardní literaturou a prameny, které popisují specifické podmínky a postupy pro konstrukci, manipulaci a izolaci makromolekul (např. DNA molekuly, plazmidy, atd.), tvorbu rekombinantních organismů a screening a izolaci genů (viz například Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1989; Mailga a kol., *Methods in Plant Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press, 1995; Birren a kol., *Genome Analysis: volume 1, Analyzing DNA*, (1997); volume 2, *Detecting Genes*, (1998); volume 3, *Cloning Systems*, (1999), volume 4, *Mapping Genomes*, (1999), Cold Spring Harbor, New York).

Promotorové sekvence vynálezu mohou být vloženy do expresivního vektoru pomocí markerů s možností screeningu nebo scorable markerů, jak je popsáno a vyzkoušeno v transientních analýzách, které poskytují indikaci genové exprese ve stabilních rostlinných systémech. Odborníci způsoby testování genové exprese pomocí transientních metod znají. Transientní exprese marker genů se prokázala na mnoha rostlinách, tkáních a na systémech dodávky DNA. Například mohou druhy tranzičních analýz zahrnovat, avšak nejsou omezeny na přímou dodávku genu pomocí elektroportace nebo bombardování tkáně částicemi v jakémkoliv zkoušce transientní rostliny za použití jakéhokoliv rostlinného druhu našeho zájmu. Takové tranziční systémy zahrnují, avšak nejsou omezeny na protoplasty ze suspenzní kultury v pšenici (Zhou a kol., *Plant Cell Reports* 12:612, 1993), elektroportace listových protoplastů pšenice (Sethi a kol., *J. Crop Sci.* 52:152, 1983); elektroportace protoplastů připravených z tkáně kukuřice (Sheen, J. *The Plant Cell* 3:225, 1991), nebo bombardování specifické tkáně našeho zájmu částicemi. Vynález obsahuje použití jakéhokoliv transientního expresivního systému pro určení regulačních sekvencí operativně navázaných na vybrané reporter geny, marker geny nebo agronomické geny našeho zájmu. Příklady možných rostlinných tkání pro testování v transientech pomocí vhodného systému dodávky zahrnují, avšak nejsou omezeny na tkáně listové

báze, kalus, děložní lístky, kořeny, endosperm, embrya, květní tkáň, pyl a epidermální tkáň.

Pro transientní zkoušku se může použít jakýkoliv marker s možností screeningu nebo scorable marker. Mezi výhodné marker geny pro transientní analýzu promotorů nebo 5' regulačních sekvencí vynálezu patří gen GUS (kódující sekvenční pro β

glukuronidázu) nebo gen GFP (kódující sekvenční pro zeleně fluoreskující protein). Expresivní vektory obsahující 5' regulační sekvenční operativně navázané na marker gen jsou dopravovány do tkání a tkáně se analyzují vhodným mechanismem, který závisí na markeru. Kvantitativní nebo kvalitativní analýzy se používají jako nástroj pro vyhodnocení potenciálního profilu exprese 5' regulačních sekvencí, pokud jsou operativně navázány na agronomicky důležité geny ve stabilních rostlinách. Nakonec jsou promotorové sekvenční vynálezu přímo začleněny do vhodných rostlinných transformačních expresivních vektorů, obsahujících 5' regulační sekvenční operativně navázané na selektivní markery a geny našeho zájmu. Dále se transformují do rostlin a tyto rostliny se poté analyzují na požadovaný expresivní profil dodaný 5' regulačními sekvencemi.

Odborníci si jsou vědomi vhodných vektorů pro transformaci rostliny. Vhodné vektory zahrnují, avšak nejsou omezeny na neaktivované Ti-plazmidy pro *Agrobacterium*-zprostředkované metody. Tyto vektory mohou obsahovat rezistentní marker, 1-2 T-DNA okraje a místa ori pro *E. coli* a *Agrobacterium* spolu s jedním nebo více geny našeho zájmu a přidruženými regulačními oblastmi. Odborníci si jsou vědomi, že pro *Agrobacterium*-zprostředkované metody je dostupných několik řetězců a způsobů. Takové řetězce mohou zahrnovat, avšak nejsou omezeny na *Agrobacterium* řetězce C58, LBA4404, EHA101 a EHA105. Obzvláště výhodné řetězce jsou řetězce *Agrobacterium tumefaciens*. Další DNA dopravní systémy pro rostlinnou transformaci jsou také u odborníků známy a například zahrnují, ale nejsou omezeny na bombardování vybraných rostlinných tkání částicemi.

Mezi ukázkové nukleové kyseliny, které mohou být zavedeny pomocí způsobů toho vynálezu, mohou například patřit DNA sekvenční nebo geny z jiných druhů nebo dokonce geny nebo sekvenční, které mají původ ve stejném druhu nebo jsou ze stejného druhu, ale spíše jsou zabudované do recipientních buněk metodami genetického inženýrství, než klasickou reprodukcí nebo pěstitelskými technikami. Avšak vý-

raz exogenní se zde má také týkat genů, které normálně nejsou přítomny v buňce, která má být transformována, anebo jen nejsou přítomny v takovéto formě, struktuře, atd., jak je lze nalézt v transformujícím DNA segmentu nebo genu, nebo genů, které jsou zde již normálně přítomny podle požadavků, např. když mají mít nadměrnou expresi. Proto termín „exogenní“ gen nebo DNA se vztahuje na jakýkoliv gen nebo DNA segment, který je zaveden do recipientní buňky, bez ohledu na to, jestli v této buňce již nějaký takový gen je přítomen. Druh DNA obsažený v exogenní DNA může obsahovat DNA, která je již v rostlinné buňce přítomna, DNA z jiné rostliny, DNA z rozdílného organismu nebo DNA vytvořenou externě, jako jsou DNA sekvence obsahující antimediátorovou genovou informaci nebo DNA sekvence kódující syntetickou nebo modifikovanou verzi genu.

Rostlinné transformační vektory obsahující promotorové sekvence vynálezu, mohou být do rostlin zavedeny způsobem jakékoliv rostlinné transformace. Je dostupných několik způsobů, jak zavést DNA sekvence do rostlinných buněk a jsou v oboru dobře známé. Vhodné způsoby zahrnují, avšak nejsou omezeny na bakteriální infekce, binární bakteriální umělé chromozomové vektory, přímá doprava DNA (např. pomocí PEG-zprostředkované transformace, desikačně/inhibičně zprostředkovaný příjem DNA, elektroportace, míchání s vlákny karbidu křemíku a akcelerací částic pokrytých DNA (porovnáno s Potrykus, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42: 205,1991).

Způsoby pro specifickou transformaci dvouděložných rostlin využívají hlavně *Agrobacterium tumefaciens*. Například rostliny, kterých se to týká, zahrnují, avšak nejsou omezeny na bavlnu (U. S. Patent č. 5,004,863; U. S. Patent č. 5,159,135; U. S. Patent č. 5,518,908, WO 97/43430), sóju (U. S. Patent č. 5,569,834; U. S. Patent č. 5,416,011; McCabe a kol., Bio/Technology, 6: 923, 1988; Christou a kol., Plant Physiol., 87: 671,1988); brukev (U. S. Patent č. 5,463,174), a podzemnici olejné (Cheng a kol., Plant Cell Rep., 15: 653,1996).

Podobné způsoby se uvádí pro transformaci jednoděložných rostlin. Transformace a regenerace rostlin za použití těchto způsobů byla popsána u mnoha plodin, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na chřest (*Asparagus officinalis*; Bytebier a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84: 5345,1987); ječmen (*Hordeum vulgare*; Wan a Lemaux, Plant Physiol., 104: 37,1994); kukuřici (*Zea mays*; Rhodes, C. A., a kol., Science, 240: 204,1988; Gordon-Kamm, a kol., Plant Cell, 2: 603, 1990; Fromm, a kol., Bio/Technology, 8: 833, 1990; Koziel, a kol., Bio/Technology, 11: 194,

1993); oves (*Avena sativa*; Somers, a kol., Bio/Technology, 10: 1589, 1992); sadový trávnik (*Dactylis glomerata*; Horn, a kol., Plant Cell Rep., 7: 469, 1988); rýži (*Oryza sativa*, včetně indických a japonských odrůd, Toriyama, a kol., Bio/Technology, 6: 10, 1988; Zhang, a kol., Plant Cell Rep., 7: 379, 1988; Luo a Wu, Plant Mol. Biol. Rep., 6: 165, 1988; Zhang a Wu, Theor. Appl. Genet., 76: 835, 1988; Christou, a kol., Bio/Technology, 9: 957, 1991); širok (*Sorghum bicolor*, Casas, A. M., a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90: 11212, 1993); cukrovou třtinu (*Saccharum* spp.; Bower a Birch, Plant J., 2: 409, 1992); kostřavu rákosovitou (*Festuca arundinacea*; Wang, Z. Y. a kol., Bio/Technology, 10: 691, 1992); travu pro trávníky (*Agrostis palustris*; Zhong a kol., Plant Cell Rep., 13: 1, 1993); pšenici (*Triticum aestivum*; Vasil a kol., Bio/Technology, 10: 667, 1992; Weeks T., a kol., Plant Physiol., 102: 1077, 1993; Becker, a kol., Plant, J. 5: 299, 1994), a vojtěšku (Masoud, S. A., a kol., Transgen. Res., 5: 313, 1996). Odborníkům je zřejmé, že je možné použít a modifikovat několik transformačních postupů pro produkci stálých transgenních rostlin z jakéhokoli množství cílových plodin našeho zájmu.

Transformované rostliny se analyzují na přítomnost genů našeho zájmu a zkoumá se hladina a/nebo profil exprese dodaný promotorovými sekvencemi vynálezu. Odborníci jsou si vědomi množství dostupných způsobů pro analýzu transformovaných rostlin. Je použito různých způsobů pro zkoumání exprese genu a určení, zda se zavedený gen (geny) integroval, zda správně funguje a zda se dědí tak, jak se předpokládalo. Pro tento vynález mohou být promotory vyhodnoceny pomocí určení hladin exprese genů, ke kterým jsou promotory operativně navázány. Předběžné stanovení promotorové funkce se může určit pomocí tranzientní metody za použití reporter genů, ale přesnější stanovení promotorové funkčnosti lze dosáhnout analýzou stabilních rostlin. Způsoby analýzy rostlin zahrnují, avšak nejsou omezeny na Southern a Northern hybridizaci, postupy založené na PCR, biochemické analýzy, způsoby screeningu fenotypu, hodnocení polí a imunodiagnostické zkoušky.

Způsoby vynálezu zahrnují, avšak nejsou omezeny na přípravu cDNA knihovny, přípravu genomických knihoven, sekvenování, sekvenční analýzy, technologie PCR, konstrukci vektorů, prozatímní zkoušky a způsoby transformace rostlin, které jsou odborníkům dobře známy a provádí se standardními technikami nebo jejich modifikacemi.

Následující příklady jsou uvedeny pro demonstraci výhodných provedení vynálezu. Odborníci jistě ocení, že popsané techniky v následujících příkladech repre-

zentují takové techniky objevené vynálezci, které jsou dobře použitelné při provozování vynálezu. Proto si odborníci jistě uvědomí, že v rámci smyslu vynálezu, lze provést mnoho změn jednotlivých provedení, které jsou dále popsány, a přitom se obdrží téměř shodný nebo podobný výsledek, aniž by se odklonilo od rozsahu vynálezu. Proto všechny dále uvedené dokumenty a doprovodné obrázky je třeba chápat jako ilustrativní materiály, ne jako materiály limitující možnosti vynálezu.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 je mapa plazmidu pMON19469

Obr. 2 je mapa plazmidu pMON43623

Obr. 3 je mapa plazmidu pMON42410

Obr. 4 je mapa plazmidu pMON42411

Obr. 5 je mapa plazmidu pMON25455

Obr. 6 je mapa plazmidu pMON46124

Obr. 7 je mapa plazmidu pMON43644

Obr. 8 je mapa plazmidu pMON45361

Obr. 9 je mapa plazmidu pMON43716

Obr. 10 je mapa plazmidu pMON43738

Obr. 11 je mapa plazmidu pMON45362

Obr. 12 je mapa plazmidu pMON43722

Obr. 13 je mapa plazmidu pMON43739

Obr. 14 je mapa plazmidu pMON45360

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Rostlinný materiál, izolace DNA a konstrukce knihovny

Pro přípravu knihoven kukuřice je použito několik tkání a vývojových stádií rostliny. Odborníci si jsou vědomi různých možností výběru tkáně a přípravy, které se různí od jednoho vzorkovače tkáně ke druhému. Následují podmínky pro cílové knihovny:

Podmínky pro růst rostlin. Semena se zasadí do hloubky asi 3 cm do půdy v květináčích o průměru 5-7,5 cm, které obsahují růstové médium Metro Mix 200

a asi po 2-3 týdnech se přesadí do větších květináčů o průměru asi 25 cm, které obsahují stejnou půdu. Přidává se Peters 15-16-17 hnojivo o koncentraci 150 ppm N, a to asi 3krát za týden po přesazení. Poté se přidává asi 2-3krát během života rostliny od přesazení po dobu květu. Do každého květináče se přidá asi 900 mg Fe. Rostliny kukuřice se pěstují ve skleníku při cyklech 15 hod den/9 hod noc. Teplota během dne se udržuje na 27 °C (80 °F) a noční teplota je 21 °C (70 °F). Osvětlení zajišťují 1000 W sodíkové výbojky.

Izolace tkáně. cDNA knihovna střapce nedospělé kukuřice (SATMON021) se vytvoří z nedospělých kukuřičných (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb Illinois, U. S. A.) střapců při V8 vývojovém stadiu rostliny. Tento střapce je nezralý střapce o délce asi 2-3 cm. Střapce se posbírají a zmrazí v kapalném dusíku a získaná tkáň se uchovává při mínus 80 °C, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna kořene kukuřice (SATMON010) se vytvoří z kukuřičné (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb Illinois, U. S. A.) tkáně kořenu při V8 vývojovém stadiu rostliny. Kořenová tkáň se shromažďuje když je kukuřice ve stadiu 8.listu. Kořenový systém se odřeže od rostliny, promyje vodou a zbaví zeminy. Tkáň se zmrazí v kapalném dusíku a získaná tkáň se uchovává při -80 °C, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna listu kukuřice (SATMON004) se vytvoří z kukuřičné (B73 x Mol7, Illinois Foundation Seeds, Champaign, Illinois U. S. A.) tkáně celého listu při V6 vývojovém stadiu rostliny. Starší listy ve spodní části a mladší listy v horních pozicích se useknou u začátku listu. Listy se shromáždí a okamžitě se nechají zmrznout v kapalném dusíku a rozdrtí se. Získaná tkáň se uchovává při -80 °C, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna primárního kořínku (SATMON007) se vytvoří z tkáně primárního kořínku kukuřičných (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb, Illinois U. S. A) semenáčků starých 5 dnů. Semena se vysadí na vlhký filtrační papír v zakryté bedničce a schovají se do tmy, dokud nezačnou klíčit (jeden den). Po vyklíčení se bednička obsahující vlhký filtrační papír přemístí do skleníku s cyklem 15 hod den/9 hod noc a nechá se růst, dokud nejsou sazenice staré 5 dnů. Teplota během dne se udržuje na 27 °C a noční teplota je 21 °C. Tkáň se shromažďuje při stáří sazenic 5 dnů. Při tomto stadiu primární kořínek (radikula) penetruje přes kořenovou pochvu, která se protlačila přes obal semena. Primární kořínek, který je asi 2-3 cm dlouhý, se oddělí a zmrazí v kapalném dusíku. Získaná tkáň se uchovává při -80 °C, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna kukuřičného prvoklíčku (SATMON008) se vytvoří z prvoklíčku (coleoptile 2-3 cm) kukuřičných (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb, Illinois U. S. A.) semenáčků, které jsou staré přibližně 5 dnů (stejně podmínky, jako pro získání knihovny primárního kořínku). Coleoptile se oddělí od zbytku semenáčku a okamžitě se zmrazí v kapalném dusíku a uchovává se při -80 °C, dokud se nepřipraví RNA.

cDNA knihovna kukuřičného nevyvinutého listu (SATMON011) se připraví z kukuřice (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb, Illinois U. S. A.). Tkáň se shromažďuje když je kukuřice ve stadiu 6.listu. Druhý nejmladší list, který je pod apikálním (vrcholovým) listem V6 kukuřičné rostliny, se usekne u začátku a okamžitě se přenesse do nádoby s kapalným dusíkem a listy se podrtí. Získaná tkáň se uchovává při -80 °C, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna kukuřičného meristému (SATMON013) se připraví z kukuřice (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb, Illinois U. S. A.). Kukuřičná rostlina je ve stadiu 4.listu. List, který je na vrcholku rostliny kukuřice ve stadiu V4, se nazývá zakladatel meristému. Tento apikální zakladatel meristému se uřeže a okamžitě zmrazí v kapalném dusíku a podrtí se. Získaná tkáň se uchovává při -80 °C, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna kukuřičného pláště (SATMON016) se připraví z kukuřice (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb, Illinois U. S. A.). Tkáň pláště se shromažďuje z kukuřičné rostliny ve stadiu V8. Když jsou kukuřičné rostliny ve stadiu V8, páté a šesté spodní listy již mají plně vyvinuté listové čepele. Na spodu těchto listů je jazýček diferenciovaný a listová čepel se spojuje v plášť. Plášť se odstraní od spodu listu a rozdrcený se vloží do kapalného dusíku. Získaná tkáň se uchovává při -80 °C, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna kukuřičného stonku (stem) (SATMON019) se připraví z kukuřice (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb, Illinois U. S. A.). Rostlina je ve vývojovém stadiu V8 a páté a šesté listy od spodu mají plně vyvinuté listové čepele. Shromažďuje se oblast mezi koleny 5. a 6. listů od spodu. Listy se odtrhnou a plášť se také odtrhne od stonku. Stonková tkáň se zcela zbaví listové a plášťové tkáně. Tkáň se zmrazí v kapalném dusíku a uchovává při -80 °C, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna nezralých střapců (SATMON001) se vytvoří z kukuřice (B73, Illinois Foundation Seeds, Champaign, Illinois U. S. A.). Nezralé kukuřičné střapce se shromažďují při V6 vývojovém stadiu. Střapce o délce 2-3 cm se shromažďují a

zmrazí v kapalném dusíku. Získaná tkáň se uchovává při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna kukuřičného ouška (SATMON023) se vytvoří z kukuřice (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb, Illinois U. S. A.). Tkáň se sbírá při V8 vývojovém stadiu. Délka sbíraného ouška je asi 10-15 cm a vlákna kvetoucí kukuřice jsou čerstvě vyrostlé (přibližně dva a půl centimetru). Ouško je spolu s vlákny kvetoucí kukuřice zmrazeno v kapalném dusíku a tkáň se uchovává při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna kukuřičných semenáčků vypěstovaných při nadostatku světla (SATMON029) se vytvoří z kukuřice (DK604, DEKALB Genetics, Dekalb, Illinois U. S. A.). Semínka se nechají vyklíčit na vlhkém filtračním papíře v zakryté bedničce, která se nechá stát 4 dny ve tmě. Teplota během dne je okolo $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ a noční teplota asi $21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tkáň se shromažďuje při stáří semenáčků 4 dny. Všechny struktury semenáčků se zdají být tenké a prodloužené. Primární kořinky protrhly kořenovou pochvu a jsou asi 4-5 cm dlouhé. Také se objevují sekundární laterální kořinky. Coleoptile se také dostane skrze obal semena a je asi 4-5 cm dlouhý. Semenáčky se zmrazí v kapalném dusíku a rozdrtí. Tkáň se uchovává při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, až do přípravy RNA.

cDNA knihovna kukuřičného endospermu (22 dnů po opylení, nebo také jinak značeno 22-DAP) (SATMON036) se vytvoří z kukuřice RX601. Růstové podmínky byly následující: kukuřičné semínka se sterilizují po dobu 1 minuty v 10% roztoku Cloroxu, zabalí se do papíru určeného pro klíčení a nechá se klíčit v 0,5 mM roztoku síranu vápenatého po dobu dvou dnů při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Semenáčky se přesadí do rašelinové směsi do 12,5 cm květináčů o hustotě 3 semenáčky na květináč. Semenáčky se nechají růst ve skleníku a dvacet květináčů se nechá v prostředí o velkém obsahu CO_2 (1000 ppm CO_2) a dvacet rostlinek se nechá vyrůst při asi 450 ppm CO_2 . Rostliny se ručně zalévají a lehce se přihnojují hnojivem Peters 20-20-20. Po 10 dnech od vysazení se klíčky z obou atmosfér umístí do kapalného dusíku a lehce se podrtí v ruce. Kořinky se promyjí destilovanou vodou, aby se oddělila většina půdy a zmrazí se v kapalném dusíku. Tkáň se uchovává při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, až do přípravy RNA.

Pro přípravu cDNA knihoven se RNA přečistí pomocí prostředku Trizol, který dodávají Life Technologies (Gaithersburg, Maryland), používá se podle doporučení výrobce. Poly A+ RNA (mRNA) se přečistí pomocí magnetických oligo dT kuliček tak,

jak je doporučeno výrobcem (Dynabeads, Dynal Corporation, Lake Success, New York).

Konstrukce cDNA knihoven je v oboru dobře známá a existuje několik klonovacích postupů. Komerčně je dostupných několik sestav pro konstrukci cDNA knihovny. Zde je použito The Superscript™ Plasmid System for cDNA synthesis and Plasmid Cloning (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD) za dodržení podmínek doporučených výrobcem.

cDNA knihovny se umístí na LB agar, který obsahuje vhodné antibiotika pro selekci, a nechá se inkubovat při 37 °C po dostatečnou dobu, aby mohli růst individuální kolonie.

Jednotlivé kolonie se po jedné umístí do jednotlivých jamek na mikrotitrační destičce obsahující 96 jamek, které obsahují LB kapalinu se selektivními antibiotiky. Destičky se nechají inkubovat přes noc při asi 37 °C za jemného promíchávání pro zlepšení růstu kultur. Plazmidová DNA se izoluje z každého klonu za použití sestav Qiaprep Plasmid Isolation při podmínkách doporučených výrobcem (Qiagen Inc., Santa Clara, CA).

Matricové plazmidové DNA klony se použijí pro následující sekvenování. Pro sekvenování se použije sestava ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit s polymerázou AmpliTaq® DNA Polymerase, FS, (PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

Příklad 2

Identifikace promotorů

Pro identifikaci vhodných promotorů pro expresi operativně navázaných DNA sekvencí v několika tkáních se využije databáze EST sekvencí odvozená od cDNA knihoven připravených z různých kukuřičných tkání. Sekvence se také používají pro tvorbu dotazovacích sekvencí pro vyhledávání v GenBank databázích, které obsahují dříve identifikované a zaznamenané sekvence a také se dají využít pro vyhledávání oblastí homologie za použití BLAST programů. Výběr přepsaných sekvenčních tagů (ESTs) pro následnou izolaci promotoru odráží přítomnost jedné nebo více sekvencí mezi přítomnými ESTs z namátkového odběru vzorků individuální cDNA knihovny nebo sbírky cDNA knihoven. Pro identifikaci regulačních sekvencí, které řídí expresi transkriptů v cílových tkáních našeho zájmu, z EST sekvencí v databázi, se vytvoří vyhledávání v podmnožinách, tedy vyhledávání ESTs, které jsou obsaženy v cílových

databázích, jako jsou databáze listů, ouško, stonek, střepec, meristém, kořen a semenáček. Vyhledávání promotorů pro expresi genů s glyfosátovou tolerancí se provádí podrobným výběrem knihoven reproduktivních a rychle se dělících tkání, dokud lze identifikovat vhodné 5' sekvence pro vegetativní a reproduktivní toleranci. Vybrané cíle se podrobí elektronické northernové funkci, při které se zobrazí domnělý profil exprese tkáně a zobrazí se hladiny výskytu v knihovně pro dané EST. Identifikují se cílové ESTs s požadovaným profilem exprese a hladiny výskytu a navrhnou se gen specifické primery na základě identifikované EST sekvence. Procenta výskytu se vztahují k tomu, kolikrát se členové skupiny vztažených sekvencí objeví v knihovně, ze které jsou EST odvozeny.

Lze vybrat několik parametrů pro obdržení vybraných ESTs a tento výběr bude záviset na dostupné EST databázi a počítačovém programu vybraných pro sekvenční analýzu a vyhledávání. U promotorů 5' regulačních sekvencí ze SEKV. ID. Č.: 53-75, se používá procentuální výskyt ve vybraných knihovnách od 0,05 až 0,50.

Tabulka 1 poskytuje informace o původu a identifikaci klonu (EST), knihovní zdroje a identifikátor (g) v GenBank pro ESTs, který se používá pro následnou izolaci promotorových sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75. Anotace k sekvencím jsou zaznamenány pro jednotlivé identifikační čísla klonů, založené na vyhledávání pomocí GenBank BLAST, s omezením p-hodnoty 10⁻⁸. Informace se může dále měnit při vkládání nových sekvencí do databází. Anotace pro ESTs jsou dále uvedeny s charakteristikou sekvencí v závorkách (*českým textem psaným kurzívou je uvedena charakteristika sekvencí v závorkách*):

Klon ID 700333814 (kukuřičná mRNA pro cysteinproteinázu, klon CCP, kompletní cds);

Klon ID 700806028 (kukuřičná mRNA pro enolázu);

Klon ID 700210506 (*H. vulgare* mRNA pro UDP pyrofosforylázu);

Klon ID 700043360 (kukuřičný pyruvát, ortofosforečnandikinázová mRNA, kompletní cds);

Klon ID 700094769 (pšeničná mRNA pro cytosolickou fosfoglycerátkinázu);

Klon ID 700150082 (*Z. mays* mRNA řetězce B73 beta-D-glukozidázy, jaderný gen kódující protein chloroplastu, kompletní cds);

Klon ID 700094721 (pšeničná mRNA pro cytosolickou fosfoglycerátkinázu);

Klon ID 700164347 (*Z. mays* W-22 histon H2A mRNA, kompletní cds), dva klony SEKV. ID. Č.: 53 a SEKV. ID. Č.: 54, které obsahují asi 2,0 kb dalších sekvencí;

Klon ID 700154443 (*Z. mays* elongační faktor 1-alfa);

Klon ID 700017196 (*Z. mays* gen pro cyklofilin);

Klon ID 700342364 (*Z. mays* mRNA pro faktor iniciace translace 5A);

Klon ID 700342580 (*Z. mays* MNBlb mRNA pro DNA-vážíci protein);

Klon ID 700342746 (*Z. mays* mRNA ribozomálního proteinu S8, kompletní cds);

Klon ID 700164205 (*Z. mays* gen DNAJ-příslušného proteinu ZMDJ1 (mdJ1), kompletní cds);

Klon ID 700343485 (mRNA příbuzné širokovému proteinu teplotního šoku 70 (hsc70));

Klon ID 700345557 (*Z. mays* mRNA ubichitin vážícího enzymu (UBC), kompletní cds);

Klon ID 700345819 (*Z. mays* peroxid dismutázový 4A (sod4A) gen, kompletní cds);

Klon ID 700345704 (*V. faba* mRNA guanin nukleotidového regulačního proteinu, kompletní cds).

Tabulka 1. Souhrnné informace o promotorech

<u>SEKV. ID. Č.</u>	<u>Klon ID číslo</u>	<u>Zdroj knihovny</u>	<u>GenBank Identifikátor (g)</u>
57	700046047	list	bez označení
62	700333814	stonek (stem)	g643596
58	700806028	endosperm, 22-DAP	g22272
61	700210506	plášť	g212995
59	700043360	list	g168579
60	700094769	prvoklíček	g21834
63	700150082	primární kořínek	g4096601
64	700094721	prvoklíček	g21834
53	700164347	meristém	g473602
54	700164347	meristém	g473602
55	700154443	primární kořínek	g2282583
56	700017196	nezralý střípec	g829147

65	700342364	nezralý střepec	g1546918
72	700342580	nezralý střepec	g397395
73	700342976	nezralý střepec	bez označení
66	700342746	nezralý střepec	g1498052
75	700350638	ouško, rostoucí vlákna kvetoucí kukuřice	bez označení
67	700342649	nezralý střepec	bez označení
68	700164205	meristém	g2984708
69	700343485	nezralý střepec	g1181672
70	700345557	nezralý střepec	g2668743
71	700345819	nezralý střepec	g1899026
74	700345704	nezralý střepec	g395071

Příklad 3

Konstrukce genomické knihovny, PCR amplifikace a izolace promotorů

Pro získání genomických knihoven se izoluje kukuřičná DNA (z kukuřičného hybridu Fr27 X FrMo17) pomocí CsCl purifikačního postupu podle Ausubel a kol., 1992, pomocí CTAB purifikačního způsobu (Rogers a Bendich, Plant Mol. Biol., 5:69, 1988), nebo podobným způsobem izolace DNA vhodným pro izolaci rostlinné DNA. Reagencie jsou komerčně dostupné (viz např. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Knihovny se připraví podle instrukcí výrobce (GENOME WALKER, což je obchodní značkou CLONTECH Laboratoriem, Inc., Palo Alto, CA). V oddělených reakcích se genomická DNA podrobí neštěpení restriční enzymem přes noc při 37 °C s následujícími endonukleázami se zarovnanými konci: EcoRV, ScaI, DraI, PvuII nebo StuI (CLONTECH Laboratoriem, Inc., Palo Alto, CA). Reakční směsi extrahují směsí fenol:chloroform, vysráží se ethanolem a resuspendují v Tris-EDTA tlumiči. Přečištěné fragmenty genomické DNA se zarovnanými konci se poté váží na GenomeWalker™ adaptéry a navázání DNA fragmentů na adaptéry se provádí podle postupu výrobce. Podknihovny GenomeWalker™ se rozdělí na alikvotní díly a uchovávají při -20 °C.

Genomická DNA navázaná na GenomeWalker™ adaptér (viz výše) se podrobí prvnímu kolu PCR amplifikace s gen-specifickým primerem 1 (GSP1) a s primerem, který tepelně hybridizuje na adaptérovou sekvenci, což je adaptér primer

1 (AP1) SEKV. ID. Č.:1. Zředěný (1:50) alikvot primární PCR reakce se použije jako vstupní DNA pro vnořené kolo PCR amplifikace s gen-specifickým primerem 2 (GSP2) a adaptér primerem 2 (AP2) SEKV. ID. Č.:2, nebo adaptér primerem 3 (AP3) SEKV. ID. Č.:3. Teploty pro teplotní hybridizaci GenomeWalker™ primárního primeru (AP1) a nested primeru (AP2) jsou 59 °C a 71 °C, v daném pořadí. Obecně jsou gen specifické primery navrženy tak, aby měli následující vlastnosti: délka 26-30 nukleotidů, 40-60% obsah GC s výslednými teplotami většiny gen-specifických primerů do rozsahu 60 °C nebo asi 70 °C. Použitá Taq polymeráza je Amplitaq Gold™, je k dostání od Perkin-Elmer Biosystems (Branchbury, New Jersey). Existuje několik komerčně dostupných teplotních cyklovačů a sestav s chemikáliemi pro provádění PCR experimentů a jsou dostupné od PE Biosystems (Foster City, CA), Strategene (La Jolla, CA) a MJ Research Inc. (Watertown, MA). Následně po primární PCR reakci se odebere alikvot (10-15 µl) pro analýzu na agarovém gelu. Izolace každé neznámé sekvence vyžadovala amplifikaci od 5 sub-genomických knihoven a negativní kontrolu (bez DNA).

Zde jsou uvedené běžně používané PCR komponenty a podmínky:

PRIMÁRNÍ PCR (způsob 1)

komponenta	množství/požadovaný objem
alíkvt subknihovny	1 µl
gen-specifický primer 1	1 µl (100 pmol)
GenomeWalker™ adaptér primer 1 (AP1)	1 µl
dNTP mix (10 mM každého dNTP)	1 µl
DMSO	2,5 µl (nebo 2-5 % výsledné konc.)
10X PCR tlumivý roztok (obsahující MgCl ₂)	5 µl (výsledná koncentrace 1X)
Amplitaq Gold™	0,5 µl
destilovaná voda	pro výsledný reakční objem 50 µl

Reakční podmínky pro primární PCR:

A. 9 minut při 95 °C

B. 94 °C po dobu 2 s, 70 °C po dobu 3 min; 7krát opakovaný cyklus 94 °C/70 °C

C. 94 °C po dobu 2 s, 65 °C po dobu 3 min; 36krát opakovaný cyklus
94 °C/65 °C

D. 65 °C po dobu 4 min jako poslední prodloužení

E. 10 °C pro prodlouženou inkubaci

Nested PCR (sekundární PCR reakce)

komponenta	množství/požadovaný objem
primární PCR reakce zředěná 1:50	1 µl
gen-specifický primer 2	1 µl (100 pmol)
GenomeWalker™ adaptér primer 2 nebo 3 (AP2 nebo AP3)	1 µl
dNTP mix (10 mM každého dNTP)	1 µl
DMSO	2,5 µl
10X PCR tlumivý roztok (obsahující MgCl ₂)	5 µl (výsledná koncentrace 1X)
Amplitaq Gold™	0,5 µl
destilovaná voda	pro výsledný reakční objem 50 µl

Reakční podmínky pro nested PCR:

A. 9 minut při 95 °C

B. 94 °C po dobu 2 s, 70 °C po dobu 3 min; 5krát opakovaný cyklus
94 °C/70 °C

C. 94 °C po dobu 2 s, 65 °C po dobu 3 min; 24krát opakovaný cyklus
94 °C/65 °C

D. 65 °C po dobu 4 min jako poslední prodloužení

E. 10 °C pro prodlouženou inkubaci

Odborníci si jsou vědomi možností variací PCR podmínek včetně výběru polymerázy, cyklických podmínek a koncentrací reakčních komponent. Další modifikace výše uvedeného postupu včetně použití Expand High Fidelity polymerázy (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), Taq polymerázy (Promega Corp., Madison, WI) a mírné variace v teplotě jsou uvedeny níže:

MODIFIKACE 1: Polymeráza (Expand High Fidelity, Boehringer Mannheim,
IN)

Primární PCR reakce

- krok 1 95 °C 2 min
- krok 2 94 °C 2 s
- krok 3 72 °C 3 min
- krok 4 krok 2 a 3 se opakuje 7krát
- krok 5 94 °C 2 s
- krok 6 68 °C 3 min
- krok 7 krok 5 a 6, 36krát

Sekundární PCR reakce

- krok 1, krok 2, krok 3 (stejně jako primární PCR reakce)
- krok 4 krok 2 a 3 se opakuje 5krát
- krok 5 a krok 6 (stejně jako primární PCR reakce)
- krok 7 krok 5 a krok 6, 24krát

MODIFIKACE 2: Polymeráza (Amplitaq Gold™, Perkin Elmer, Foster City, CA)

Primární PCR reakce

- krok 1 95 °C 10 min
- krok 2 94 °C 2 s
- krok 3 70 °C 3 min
- krok 4 krok 2 a 3 se opakuje 7krát
- krok 5 94 °C 2 s
- krok 6 68 °C 3 min
- krok 7 krok 5 a krok 6 se opakuje 24krát

MODIFIKACE 3: Enzym polymeráza je Taq (Promega Corp., Madison, WI),
stejně cyklické podmínky jako u modifikace 2, kromě kroku 1, který se provádí po
dobu 2 minut.

MODIFIKACE 4: Enzym polymeráza je AccuTaq (Sigma, St. Louis, MO),
stejně cyklické podmínky jako u modifikace 3.

MODIFIKACE 5: Polymeráza je Expand High Fidelity (BM)

Směs	primární PCR	sekundární PCR
10X PCR tlumivý roztok	2 μ l	1 μ l
dNTP	1 μ l	1 μ l
adaptér primer (10 mM)	1 μ l AP1	1 μ l AP2
gen-specifický primer (10mM)	1 μ l GSP1	1 μ l GSP2
Polymeráza	2,5 jednotek	3,5 jednotek
matricová DNA	GenomeWalker™ knihovna 1 μ l	1:50 prim. PCR produktu
H ₂ O to	až do 20 μ l	až do 50 μ l

MODIFIKACE 5: cyklické podmínky PCR:

- krok 1 94 °C 1 min
- krok 2 94 °C 2 s
- krok 3 70 °C 3 min
- krok 4 krok 2 se opakuje dalších 5 cyklů
- krok 5 94 °C 2 s
- krok 6 68 °C 3 min
- krok 7 krok 5 se opakuje dalších 34 cyklů
- krok 8 68 °C 10 min
- krok 9 10 °C udržení teploty

MODIFIKACE 6: podmínky PCR

- krok 1 95 °C 2 min
- krok 2 94 °C 30 s
- krok 3 65 °C 30 s, snížit o 1 °C na každý cyklus po dobu 14 cyklů
- krok 4 72 °C 3 min
- krok 5 kroky 2-4 se opakují 14krát
- krok 6 50 °C
- krok 7 72 °C
- krok 8 kroky 6-7 se opakují 15krát

Modifikace 5 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 53 (Klon ID#700164347). SEKV. ID. Č.: 1 se skombinuje se GSP1 SEKV. ID. Č.: 6

v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 7 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

Modifikace 5 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 54 (Klon ID#700164347, který obsahuje další 2 kb 5' sekvence). SEKV. ID. Č.: 1 se skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 6 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEQ ID č. 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 7 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

Modifikace 5 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 55 (Klon ID#700154443). SEKV. ID. Č.: 1 se skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 8 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEQ ID č. 9 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

Modifikace 5 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 56 (Klon ID#700017196). SEQ ID č. 1 se skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 10 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEQ ID č. 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 11 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

PCR způsob 1 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 62 (Klon ID#700333814) SEKV. ID. Č.: 1 se skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 22 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 23 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

PCR způsob 1 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 59 (Klon ID#700043360). SEKV. ID. Č.: 1 se skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 16 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 17 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

PCR způsob 1 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 60 (Klon ID#700094769) SEKV. ID. Č.: 1 se skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 18 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 19 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

PCR způsob 1 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 61 (Klon ID#700210506) SEKV. ID. Č.: 1 se skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 20 in a primary PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 21 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

PCR způsob 1 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 57 (Klon ID#700046047) SEKV. ID. Č.: 1 se skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 12 v pri-

mární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 13 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

PCR způsob 1 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 58 (Klon ID#700806028). SEKV. ID. Č.: 1 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 14 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 15 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

PCR způsob 1 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 63 (Klon ID#700150082). SEKV. ID. Č.: 1 skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 24 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 25 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

PCR způsob 1 se použije pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 64 (Klon ID#70094721). SEKV. ID. Č.: 1 skombinuje s GSP1 SEKV. ID. Č.: 26 v primární PCR reakci. Pro nested PCR reakci se SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 27 v sekundární PCR reakci a PCR produkt se izoluje.

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 65 (Klon ID#700342364) se GSP1 primer o SEKV. ID. Č.: 28 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 1. Pro sekundární PCR reakci se nested primer SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 primerem o SEKV. ID. Č.: 29 a PCR produkt se izoluje, klonuje do pGEM-T easy vektoru (Promega, Madison, WI), a transformuje do E. coli HB101. Pro zavedení Stul restrikčního místa na 3' konci a HindIII místa na 5' konci promotoru se použije pGEM-T klon promotoru jako matrice při PCR reakci, za použití způsobu 6 se SEKV. ID. Č.: 3 a GSP primerem o SEKV. ID. Č.: 30.

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 66 (Klon ID#700342746) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 31 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 1. Pro sekundární PCR reakci se nested primer o SEKV. ID. Č.: 2 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 32 a PCR produkt se izoluje (~1,2 kb PCR produktu za použití DraI-naštěpené genomické knihovny). Pro zavedení Stul místa na 3' konec a HindIII místa na 5' konec se použije promotorový klon jako matrice v PCR reakci za použití způsobu 6 s adaptér primerem o SEKV. ID. Č.: 3 a GSP primerem o SEKV. ID. Č.: 33. PCR produkt se izoluje a klonuje do pGEM-T easy (Promega Corp., Madison, WI).

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 67 (Klon ID#700342649) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 34 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 2. Pro sekundární PCR reakci se nested primer SEKV. ID. Č.: 2

skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 35 a PCR produkt se izoluje. Pro zavedení Stul místa na 3' konec a HindIII místa na 5' konec se použije promotorový klon jako matrice v PCR reakci za použití způsobu 6 s adaptér primerem o SEKV. ID. Č.: 3 a GSP primerem o SEKV. ID. Č.: 33.

Pro izolaci SEKV. ID. Č.: 68 (Klon ID#700164205) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 37 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 3. Pro sekundární PCR reakci se nested primer SEKV. ID. Č.: 3. skombinuje s GSP2 primerem o SEKV. ID. Č.: 38 a PCR produkt se izoluje (~0,5 kb PCR produktu za použití StuI-naštěpené genomické knihovny) a klonuje se do pGEM-T Easy (Promega Corp., Madison, WI).

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 69 (Klon ID#700343485) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 39 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 3. Pro sekundární PCR reakci se nested primer o SEKV. ID. Č.: 3 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 40 a PCR produkt se izoluje a klonuje do pGEM-T Easy (Promega Corp., Madison, WI).

Pro izolaci promotoru o SEKV. ID. Č.: 70 (Klon ID#700345557) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 41 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 3. Pro sekundární PCR reakci se nested primer o SEKV. ID. Č.: 3 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 42 a PCR produkt se izoluje.

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 71, (Klon ID# 700345819) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 43 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 3. Pro sekundární PCR reakci se nested primer o SEKV. ID. Č.: 3 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 44 a PCR produkt se izoluje za použití EcoRV-naštěpené knihovny).

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 72 (Klon ID#700342580) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 45 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 4. Pro sekundární PCR reakci se nested primer o SEKV. ID. Č.: 3 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 46. Izoluje se PCR produkt o ~2,2 kb za použití ScaI-naštěpené knihovny.

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 73 (Klon ID# 700342976) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 47 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 podle PCR modifikace 4. Pro sekundární PCR reakci se nested primer o SEKV. ID. Č.: 3 skombinuje s GSP2

SEKV. ID. Č.: 48. Izoluje se ~40 kb PCR produkt za použití ScaI naštěpené knihovny.

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 74 (Klon ID# 700345704) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 49 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 4. Pro sekundární PCR reakci se nested primer o SEKV. ID. Č.: 3 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 50. Izoluje se ~1,3 kb PCR produkt za použití EcoRV naštěpené knihovny.

Pro izolaci promotorové sekvence SEKV. ID. Č.: 75 (Klon ID# 700350638) se GSP1 SEKV. ID. Č.: 51 skombinuje s SEKV. ID. Č.: 1 v primární PCR reakci podle PCR modifikace 4. Pro sekundární PCR reakci se nested primer o SEKV. ID. Č.: 3 skombinuje s GSP2 SEKV. ID. Č.: 52. Izoluje se ~1,0 kb PCR produkt za použití StuI naštěpené knihovny (PCR způsob 4).

Příklad 4

Izolace a klonování promotorů

Výsledné fragmenty DNA z výše popsané nested PCR amplifikace se izolují a přečistí na gelu. 40 µl alikvot ze sekundární PCR se přečistí na agarovém gelu. DNA fragment produktu sekundární PCR se přečistí na agarovném gelu za použití BIO101 GeneClean II Kit (Midwest Scientific, Valley Park, MO) za dodržení podmínek doporučených výrobcem. Přečištěná DNA se naváže na pGEM-T Easy vektor (pGEM-T Easy Vector System I, Promega Corp., Madison, WI) za dodržení podmínek doporučených výrobcem. Alikvot vazebné reakce se transformuje do vhodného E. coli hostitele, jako je DH10B a buňky se umístí na selektivní médium (pro DH10B je to 100 µl/ml karbenicilin). Vyberou se bakteriální transformanty, nechají se vyrůst v kapalně kultuře a izoluje se plazmidová DNA za použití komerčně dostupné sestavy, jako je Qiaprep Spin Microprep Kit (Qiagen Corp., Valencia, CA). Přečištěný plazmid obsahující předpokládanou velikost inzertů založenou na analýze restrikčním enzymem, se sekvenují za použití metody barevného terminátoru v obou směrech za použití M13 původních a reverzních primerů ukázaných v SEKV. ID. Č.: 4 (M13 původní primer) a SEKV. ID. Č.: 5 (M13 reverzní primer). Restrikční enzymy jsou dostupné od mnoha výrobců (viz například Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). 5' lemuující oblast obsahující promotorovou sekvenci je určena a vyobrazená v SEKV. ID. Č.: 53-75. Genetický inženýring restrikčních míst pro klonování do vhodných vek-

torů, běžně používá PCR způsob popsany ve způsobu 6, při použití standardních technik molekulární biologie, které odborníci znají.

Příklad 5

Analýza rostlinných buněk na aktivitu promotorů

Pro expresi rostlinných buněk se fragmenty promotorů klonují do expresivních vektorů, jako je pMON19469, jak je ukázáno na obrázku 1. Plazmid pMON19469 je expresivní vektor sestávající z následujících genetických komponent: P-CaMV.35S:en je promotor pro 35S RNA z květákovitého mozaikovitého viru (CaMV) obsahujícího zdvojení oblasti od -90 po -300; I-Zm.Hsp70 je intron kukuřičného proteinu teplotního šoku, jak je popsán v U. S. Patent Nos. 5,593,874, který je zde celý uveden pomocí odkazu a dále v 5,859,347, který je zde celý uveden pomocí odkazu; Ec.GUS:1 (GUS:1) je kódující oblast pro glukuronidázu; T-AGRTU.nos je terminační signál z genu nopalin syntázy izolovaného z *Agrobacterium tumefaciens*; ori-M13 a ori-pUC jsou replikační originály; AMP je regulační oblast pro výběr ampicilinu. Pokud se identifikuje iniciační AUG kodón cílového promotoru, fragment se naklonuje do pMON19469 namísto P-CaMV.35S:en genetického elementu. Pokud se iniciační AUG kodón neidentifikuje, fragment promotoru se naklonuje do expresivního vektoru, který je modifikovaný tak, aby umožnil translační fúze s reporter genem jako je β -glukuronidáza (GUS) (Jefferson a kol., EMBO J., 6: 3901,1987) nebo zelený fluorescenční protein (GFP), jak je popsáno v Pang a kol., Plant Physiol. 112: 893 (1996). pMON25455 (obr. 5) je základní expresivní vektor sestávající z rýžového aktin promotoru od Act1 genu, GUS:1 kódující sekvence a T-AGRTU.nos terminátoru. Mezi další základní expresivní vektory patří různé expresivní elementy, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na pMON42410 (obr. 3), pMON42411 (obr. 4), a pMON46124 (obr. 6). Promotorové DNA fragmenty vynálezu mohou nahradit promotorové elementy bazického expresivního vektoru pro určení promotorové aktivity DNA fragmentů.

Promotorové DNA fragmenty, které mají identifikační čísla klonů ID#s: 700342746 (SEKV. ID. Č. 66), 700342364 (SEKV. ID. Č. 65), 700350638 (SEKV. ID. Č. 75), 700164205 (SEKV. ID. Č. 68), 700343485 (SEKV. ID. Č. 69), 700345557 (SEKV. ID. Č. 70), 700345819 (SEKV. ID. Č. 71), 7003442580 (SEKV. ID. Č. 72), 700342976 (SEKV. ID. Č. 73), 700345704 (SEKV. ID. Č. 74), se klonují do GUS obsahující základní expresivní konstrukce, pomocí naštěpení restrikčním enzymem

a působením DNA ligázy na fragmenty za vhodných podmínek, které odborníci v molekulární biochemii dobře znají. Přečištěná plazmidová DNA výsledných expresivních kazet se testuje v kukuřičných protoplastech elektroportační zkouškou na GUS aktivitu. Je dostupných několik zkoušek a odborníci je dobře znají. Lze použít analýzu reporter genů v protoplastovém systému pro zjištění aktivity regulačního elementu, jako je promotor operativně navázaný na reporter gen. Izolace listového protoplastu a postup elektroportace se v zásadě provádí tak, jak popsal Sheen (Plant Cell 3: 225-245, 1991) s následujícími modifikacemi: použité semeno je FR27RHM X FRMol7RHM od Illinois Foundation Sevydavatelé Semeno je povrchově sterilizováno po dobu 2 minut v 95% ethanolu, dvakrát je vyčištěno ve sterilované vodě, 30 minut v 50% bělidle (Clorox) s 2 kapkami Tween-20, troje promytí ve sterilované vodě následovalo 5-ti minutové máčení v benlát/kaptanovém roztoku pro prevenci růstu hub. Semena se nechají klíčit v bedničkách pro rostliny obsahujících 100 ml 1/2 MS media (2,2 g/l MS solí, 0,25% gerlite), 7 semen na bedničku. Semena se nechají klíčit 5 dnů při 26 °C při 16/8 hodinových den/noc fotoperiodách a 7 dnů v temnu při 28 °C. Druhý list z každé rostliny se podélně nařeže za použití čepele č.11 ze sady chirurgických nožů (Feather no. 11). Doba naštěpení jsou dvě hodiny a 10 minut na světle při 26 °C. Po naštěpení se plátky dvakrát odstředí při 80-100 ot./min., každý po dobu 20 sekund a protoplast/enzymový roztok se pipetuje přes 190 µm tkáňový filtr. Protoplasty se počítají pomocí hemacytometru, který počítá pouze neporušené a kruhové protoplasty. Do každé kyvety se přidá od deseti do padesáti mikrogramů DNA, která obsahuje vektor našeho zájmu. Konečná hustota protoplastů je v rozsahu elektroportace od 3×10^6 /ml až $4,5 \times 10^6$ /ml. Elektroportace se provádí ve světle za použití Bio-rad Gene pulzních kyvetách (Bio/Rad Herkules, CA) s mezerou 0,4 cm a maximálním objemem 0,8 ml při kapacitanci 125 µF a 260 V. Protoplasty se inkubují na ledu po resuspenzaci v elektroportačním tlumivém roztoku a nechají se v kyvetách na ledu alespoň 10 minut po elektroportaci. Protoplasty se nechají při teplotě místnosti po dobu 10 minut před přidavkem 7 ml růstového media pro protoplasty. Kultivační půda pro protoplasty již byla popsána (Fromm a kol., Methods in Enzymology 153,351-366, 1987). Na kultivační destičky se nanese vrstva růstového media a 1,5% SeaPlaque agarosa (FMC BioProducts, Rockland, ME) pro prevenci ztráty protoplastů. Vzorky se kultivují za světla při 26 °C s cyklem 16/8 hod den/noc, dokud nebudou sklizeny pro zkoušku (obvykle 18-22 hodin po elektroportaci). Vzorky se pi-

petují z petriho misek do 15ml centrifugačních trubiček a získají se centrifugací při 800-1000 ot./min. Supernatant se oddělí a vzorky se ihned zkoumají na přítomnost genů našeho zájmu. Vzorky lze také zmrazit pro pozdější analýzu.

Měří se exprese GUS způsobená DNA promotory vynálezu, jako procenta pozorované aktivity při elektroportaci bazálního expresivního vektoru pMON25455 (P-Os.Act1/GUS/AGRTU.nos) do kukuřičných protoplastů (tabulka 2). MUG zkoušky poskytly kvantitativní analýzu exprese GUS v transgenních rostlinných buňkách. Z každého vzorku se extrahoval celý protein. Při MUG zkoušce se přidalo 500 μ l GUS extrakčního tlumivého roztoku ke tkáním a ty se rozetřely teflonovým tloučkem v 1,5ml eppendorfově nádobce a centrifugovaly se při 10tis. ot./min. pro dobu 5 minut na 4. stupni (Beckman GS-15R). 400 μ l supernatantu se převede na čistou destičku s 96 hlubokými jamkami. Extrakty se zmrazí suchým ledem a uschovají při -80 °C před dalším použitím. MUG zkouška sestávala z vytvoření kalibrační křivky aktivity s postupným zředěním 4-methylumbelliferonu (Sigma Chemical Co M1391) od 31,2 pmol až do 2000 pmol. Po nastavení rostliny na vlivy pozadí se přidalo 5 μ l každého extraktu jako duplikát na destičku s 96 mělkými jamkami (Falcon 3872). Do každé jamky se přidalo 200 μ l GUS zkušebního roztoku (0,1M K_3PO_4 o pH7,8, 1,0mM EDTA, 5% glycerol, 10,0mM DTT, 2mM 4-methylumbelliferyl glukuronid Fluka 69602) a pipetováním se smíchal se vzorky. Tato destička se kineticky snímala na F-max (Molecular Device) při 37 °C s filtračními páry: excitace 355/emise 460. Běžné snímání se skládá z 21 snímání v 3-minutových intervalech a trvá 1 hodinu. GUS aktivita (pmol/min/ μ g proteinu) se vypočítala na základě výsledků MUG a výsledků proteinů každého vzorku. Celkový protein se zkoumal pomocí Bio-Rad Protein Assay sestavy. Pro přípravu kalibrační křivky se připravily roztoky o postupném ředění od 0,05 mg/ml do 0,5 mg/ml. Jako duplikát se přidalo po 1,5 μ l extraktů na destičku s 96 mělkými jamkami (Falcon). Přidalo se 200 μ l zředěného barvicího prostředku a smíchal se vzorky. Měřila se absorbance při 595 nm na Spectromax 250 (Molecular Device) při teplotě místnosti po 5 min inkubaci při teplotě místnosti.

Provedly se tři experimenty (1,2 a 3) se dvěma opakováními a každé bylo pro zjištění exprese 10 promotorových sekvencí, jak je ukázané v tabulce 2. Tyto zkoušky identifikovaly 4 promotorové sekvence, které jsou shodné, nebo vyšší oproti sekvenci rýžového aktin 1 promotoru, tyto expresivní kazety jsou obsaženy v pMON43716 (Obr. 9), pMON43722 (Obr. 12), pMON43734 (P-Zm. 700342976/I-

Os. Act1/GUS/T-Ta. Hsp17), a pMON43736 (P-Zm. 700345704/I-Os. Act1/GUS/T-Ta. Hsp17).

Tabulka 2. Analýza kukuřičných protoplastů DNA promotorových sekvencí řídících expresi GUS:1

		pMON	fragment promotoru ~ Kb	GUS (% Os. Act1/GUS)		
				1	2	3
1	700342746 SEKV. ID. Č. 66	43710	1,2	1,4; 2,4		
2	700342364 SEKV. ID. Č. 65	43716	2,0	66; 145	126; 111	
3	700350638 SEKV. ID. Č. 75	43730	1,0		24; 32	
4	700164205 SEKV. ID. Č. 68	43720	0,5		16; 17	
5	700343485 SEKV. ID. Č. 69	43722	1,3		232; 275	
6	700345557 SEKV. ID. Č. 70	43726	1,5		26; 29	
7	700345819 SEKV. ID. Č. 71	43728	0,6		47; 54	
8	700342580 SEKV. ID. Č. 72	43732	2,2		7; NA	
9	700342976 SEKV. ID. Č. 73	43734	1,2			118,2; 100
10	700345704 SEKV. ID. Č. 74	43736	4,0			300; 409
	CaMV.35S	46124		484; 573	831; 682	1445,5; 1081,8
	Os.Act1	25455		100	100	100

Příklad 6

Transformace pšenice s rostlinnými expresivními vektory, které obsahují DNA promotorové sekvence vynálezu

Pšeničné buňky jsou transformovány DNA vektory, které obsahují DNA promotorové sekvence vynálezu, které přepisují GUS:1 reporter kódující sekvenci. pMON43644 (Klon ID#700154443) obr. 7, pMON43738 (Klon ID#700342364) obr. 10 and pMON43739 (Klon ID#700343485) obr. 13 přepisují GUS gen v listech, semenících a prašnicích transgenních pšeničných rostlin. Pšeničné rostliny jsou transformovány DNA promotorovými sekvencemi vynálezu, které přepisují AGRTU.

aroA:CP4 (CP4) kódující sekvenci glyfosátového EPSPS enzymu, takže transgenní pšeničné rostliny získávají glyfosátovou toleranci. Následující vektory jsou obsaženy v pšeničných rostlinách: pMON45360 (P-Zm. 700343485/I-Os. Act/CP4/Ta. hsp17::P-CaMV. 35S/Zm. Hsp70/CP4/T-AGRTU. nos) obr. 14, dvojitý expresivní kazetový vektor s P-Zm. 700343485 promotorem, který řídí expresi CP4 EPSPS kódující sekvence a CaMV.35S promotor, který řídí expresi další kopie CP4 EPSPS kódující sekvence;

pMON45361 (P-Zm.700154443/Ta.CAB/I-Os.Act/CP4/Ta.Hsp17::P-CaMV.35S/Zm.Hsp70/CP4/T-AGRTU.nos) obr. 8 dvojitý expresivní kazetový vektor s P-Zm. 70015443 promotorem, který řídí expresi CP4 EPSPS kódující sekvence a CaMV.35S promotor, který řídí expresi další kopie CP4 EPSPS kódující sekvence;

pMON45362 (P-Zm. 700342364/I-Os. Act/CP4/Ta. Hsp17: P-CaMV.35S/Zm. Hsp70/CP4/T-AGRTU. nos) obr. 11, dvojitý expresivní kazetový vektor s P-Zm. 700342364 promotorem řídícím expresi CP4 EPSPS kódující sekvence a P-CaMV.35S promotoru, který řídí expresi další kopie CP4 EPSPS kódující sekvence;

pMON43623 (P700164347/Ta. CAB/I-Os. Act/CP4/Ta. Hsp17) obr. 2, jednoduchý expresivní kazetový vektor s P-Zm. 700164347 promotorem řídícím expresi CP4 EPSPS kódující sekvence. Tyto vyjmenované vektory a další řídící vektory: pMON42411 (Obr. 4), pMON42410 (obr. 3) a pMON30167 (P-Os. Act/I-Os. Act/CP4/T-AGRTU. nos) jsou transformované do pšeničných buněk následujícím způsobem.

Nezralé zárodky pšenice (*Triticum aestivum* L) cv Bobwhite se izolují z nezralých caryopsis 13-15 dnů po opylení a kultivují se na CM4C (tabulka 3) po dobu 3-4 dnů. Zárodky, které vykazují aktivní buněčné dělení, ale žádný zjevný vývoj kalusu, se vyberou pro infekci *Agrobacteriem*.

Tabulka 3. Doplnující komponenty v základním mediu¹

Komponenty	CM4	CM4C	MMS.2C	MMS0
2,4-D (mg/l)	0,5	0,5	0,2	--
pichloram (mg/l) ²		2,2	2,2	
maltóza (g/l)	40,0	40,0	40,0	40,0
glutamin (g/l)		0,5	0,5	
chlorid hořečnatý (g/l)		0,75	0,7	
hydrolyzát kasein (g/l)		0,1	0,1	
MES (g/l)		1,95	1,95	1,95
kyselina askorbová (mg/l) ²		100,0	100,0	100,0
želatinační prostředek (g/l) ³	2(P)	2(P)	2(G)	2(G)

¹Všechna media obsahují základní soli (MS základní soli) a vitamíny (MS vitamíny) z Murashige a Skoog (1962). pH se v každém mediu nastaví na 5,8.

²Filtračně se sterilizuje a k mediu se přidá po autoklávování.

³Phytigel™ (P) nebo Gelrite® (G).

Pro všechny experimenty se použije deaktivovaný *Agrobacterium* řetězec C58 (ABI), který nese binární vektor našeho zájmu (pMON45367, obr. 5). pMON vektory se transferují do *Agrobacteria* triparentálním způsobem křížení (Ditta a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 73477351). Kapalně kultury *Agrobacteria* se zaočkují z glycerolového bujonu nebo z čerstvě rozočkované destičky a nechají se kultivovat přes noc při 26 °C až 28 °C za protřepávání (přibližně 150 ot./min.) na poloexponenciální fázi ($OD_{660}=1-1,5$) v kapalném LB mediu, pH 7,0, které obsahuje 50 mg/l kanamycinu, 50 mg/l streptomycinu a spektinomycinu a 25 mg/l chloramfenikolu s 200 μ M acetosyringonu (AS). Buňky *Agrobacteria* se suspendují v očkovacím mediu (kapalné CM4C) a hustota se nastaví $OD_{660}=1$. Nezralé zárodky kultivované v CM4C mediu se přenesou do sterilních petriho misek (16 x 20 mm) nebo do jamek na kultivační destičce se 6 jamkami (Costar Corporation, Cambridge, MA) obsahující 10 ml očkovacího media na petriho misku nebo 5 ml na destičku s buněčnou kulturou. Přidá se stejné množství buněčné suspenze *Agrobacteria* tak, aby konečná koncentrace buněk *Agrobacteria* byla $OD_{660}=0,5$. Ve většině experimentech se přidá pluronic F68 k očkovací směsi do konečné koncentrace 0,01 %. Poměr mezi *Agrobacteriem* a

nezralými zárodky (immature embryos-IEs) je asi 10 ml: 20-200 IEs. Zaočkování se provádí při 23 °C až 26 °C od 5-60 min. Po očkovací periodě se zbývající buňky *Agrobacteria* odstraní z explantátů pomocí vakuového zařízení. Kousek sterilního filtračního papíru Whatman č. 1 (velikost petriho misky) se umístí do každé petriho misky o velikostech 60 x 15 nebo 60 x 20 mm. Na střed filtračního papíru se umístí 200 µl sterilní vody. Po 2-3 minutách se naočkované nezralé embrya umístí do misek. Obvykle se 20-50 explantátů seskupí jako jedna skupina (velikost asi 1 cm a 60-80 mg/skupinu) se 4-5 skupinami na každé destičce. Destičky se okamžitě přikryjí Parafilm®-em a nechají se společně kultivovat v temnu při 24 °C až 26 °C po dobu 2-3 dnů.

Společně kultivované PCIEs se přenesou do CM4C+500 mg/l carbenicillin media (zpomalující medium) do tmy. Po 7 dnech na zpomalujícím mediu se nezralé embrya přenesou do CM4C doplněného 2 mM glyfosátu (nejedná se o formulaci Roundup) a 500 mg/l carbenicillinu pro selekci a nechají se zde po dobu jednoho týdne. Potom se kalusy přenesou do MMS0,2C+0,1 mM glyfosátu (nejedná se o formulaci Roundup®) +250 mg/l carbenicillin media po dobu 2 týdnů na světle pro další selekci. Embryogenní kalusy se přenesou do druhého regeneračního media MMS0C s nižší koncentrací glyfosátu (nejedná se o formulaci Roundup®) (0,02 mM) a s 500 mg/l carbenicillinu pro rostlinnou regeneraci. Tyto embryogenní kalusy se přenesou na čerstvé medium každé dva týdny. Regenerované rostlinky se přenesou do Sundae pohárků (Sweetheart Cup Copany, Chicago, IL), které obsahují druhé regenerační medium pro další růst a selekci. Jakmile jsou kořínky u transgenních rostlin dobře vyvinuty, rostliny se přenesou do půdy pro další vyhodnocení.

Vyhodnocení tolerance transgenních rostlin na glyfosát se provádí na R0 transgenních rostlinách. Glyfosát se podává postřikovačem, který má dodávat okolo 1900 ml/rychlostí A glyfosátu. Rostliny se stříkají jednou nebo dvakrát. Vegetativní tolerance na glyfosát se vizuálně hodnotí týden po postřikování na základě stupnice od 0 do 5 (0 = žádný pozorovatelný/vegetativní účinek glyfosátu; 1 = objevuje se chloróza; 2 = pokročilá chloróza, malá nekróza; 3 = pokročilá chloróza, střední nekróza; 4 = pokročilá chloróza, těžká nekróza; 5 = nezbyla žádná živá tkáň). Produkované R₀ rostliny se nechají vyhodnotit samotné a na fertilitu jako procenta nestříkaných kontrolních rostlin. U rostlin, které vykazují vegetativní toleranci a fertilitu vyšší nebo rovnu 80 %, se dále zkoumá R₁ potomstvo. Aplikují se postřiky glyfosátu a nechají se rozmnožovat, jak je popsáno pro testy R₀. Tímto způsobem se určí účinnost

promotoru. Účinná transgenní tolerance na glyfosátový herbicid a další systémové herbicidy je často funkcí povahy konstituce expresivního vzoru promotoru. Při hodnocení promotoru v tabulce 3, je mírou využitelnosti promotoru pro konstitutivní expresi procentuální zastoupení produkovaných rostlin, které vykazují vegetativní a reprodukční toleranci. Promotory P-Zm.700343485 a P-Zm.70015443 v kombinaci s P-CaMV.35S expresivní kazetou projeví vzrůst vegetativní a reprodukční tolerance transgenních pšeničných rostlin na glyfosátový herbicid. P-Zm.700342364 vykazoval nárůst vegetativní tolerance, přesto projevil snížení reprodukční tolerance. P-Zm.700164347 byl jako jediný expresivní kazetový promotor účinný při dodání vegetativní a fertilitní tolerance transgenním rostlinám. Tyto promotory v kombinaci s regulačními elementy expresivních kazet, které jsou odlišné od těch testovaných v našich demonstracích, jako jsou introny, vedoucí oblasti, transitní peptidy a 3' nepřeložené terminační oblasti mohou dále přepisovat žádané expresivní vzory, které mohou vybrat odborníci rostlinné biologie. Například jak je ukázané v tabulce 3, linie transgenních rostlin s tolerancí na glyfosát, lze vybrat s vyšší frekvencí, což vykazuje jak vegetativní tak i reprodukční toleranci při operativním navázání CaMV.35S promotoru na intron Os.Act1 v porovnání navázání na intron Zm.Hsp70. Tyto promotory jsou účinné při produkci hospodářských rostlin s herbicidní tolerancí, také jsou užitečné pro expresi genů pro rezistenci na hmyz, genů pro rezistenci na choroby, genů pro rezistenci na stres a vlastností týkajících se výnosnosti, což je také aspektem vynálezu.

Tabulka 3. Výsledky postřikování R₀ transgenní pšenice

pMON#	Promotorové elementy	počet R ₀ rostlin	vegetativ- ní tolerance	fertilita >=80%	% vyví- nutých rostlin
42411	P-CaMV.35S/I-Zm.Hsp70	71	26 (37%)	1 (4%)	1
42410	P-CaMV.35S/I-Os.Act1	150	78 (52%)	38 (49%)	25
30167	P-Os.Act1/I-Os.Act1	63	4 (6%)	2 (50%)	3
45360	P-Zm.700343485 P-CaMV.35S	25	20 (80%)	14 (70%)	56
45361	P-Zm.70015443 P-CaMV35.S	26	22 (85%)	20 (91%)	77
45362	P-Zm.700342364 P-CaMV.35S	23	14 (61%)	5 (36%)	22
43623	P-Zm.700164347	166	95 (57%)	20 (21%)	12

Příklad 7

Identifikace elementů působících v cis poloze

Regulační elementy působící v cis poloze, které jsou nezbytné pro správnou regulaci promotorem, lze identifikovat několika prostředky. V jednom způsobu se provádí deleční analýza pro odstranění oblastí promotoru a výsledné promotorové fragmenty se zkoumají na promotorovou aktivitu. DNA fragmenty jsou považovány za nezbytné pro promotorovou regulaci, pokud je aktivita zkrácených promotorů změněna v porovnání s původním fragmentem promotoru. Pomocí této deleční analýzy lze identifikovat malé oblasti DNA, které jsou nezbytné pro pozitivní nebo negativní regulaci transkripce. Lze také identifikovat motivy promotorové sekvence a lze genetickým inženýrstvím vytvořit nové promotory obsahující tyto cis elementy pro modulaci exprese operativně navázaných přepisovatelných sekvencí. Viz např. U. S. Patent č. 5,223,419, který je zde pomocí odkazu uveden celý, U. S. Patent č. 4,990,607, který je zde pomocí odkazu uveden celý a U. S. Patent č. 5,097,025, který je zde pomocí odkazu uveden také celý.

Alternativní metodou je vyhledávání podobných sekvencí mezi promotory s podobným profilem exprese. Promotory s překrývajícími se vzory aktivity mohou mít běžné regulační mechanismy. Je možné použít několik počítačových programů pro identifikaci konzervovaných motivů sekvencí mezi promotory, které zahrnují, avšak nejsou omezeny na programy jako MEME, SIGNAL SCAN nebo GENE SCAN. Tyto motivy mohou reprezentovat vazebné místa pro transkripční faktory, které způsobují regulaci promotorů. Jakmile se motivy sekvencí identifikují, je možné jejich funkci vyzkoušet. Například lze motivy sekvencí deletovat z promotoru pro určení, jestli je motiv nezbytný pro správnou funkci promotoru. Eventuelně lze motiv přidat k minimálnímu promotoru pro zjištění, jestli postačí pro aktivaci transkripce. Podezřelé negativní regulační elementy je možné testovat na schopnost aktivace transkripce tak, že se přidají k aktivnímu promotoru a zkoumá se snížení promotorové aktivity. Některé regulační elementy působící v cis poloze mohou vyžadovat pro funkci další elementy. Proto je možné testovat více elementů v různých kombinacích několika způsoby, které odborníci znají.

Jakmile se určí funkční promotorové elementy, můžou se modifikovat na nukleotidové hladině, aby ovlivňovali vazebnost proteinů. Modifikace mohou způsobit buď vyšší nebo nižší vazebnou afinitu, což by ovlivnilo hladinu transkripce tímto promotorem.

Promotorové elementy mohou působit aditivně nebo synergicky při ovlivňování aktivity promotoru. Z tohoto pohledu je možné promotorové elementy z různých 5' regulačních oblastí umístit do tandemu a obdržet tak promotor s různým spektrem aktivity nebo různým profilem exprese. Obdobně mohou kombinace promotorových elementů z heterologních zdrojů nebo duplikace podobných elementů nebo stejné elementy dodávat vyšší hladinu exprese operativně navázaných přepisovatelných sekvencí. Například se může promotorový element multimerizovat a tak zvýšit hladinu exprese ve vzoru ovlivněném promotorovým elementem.

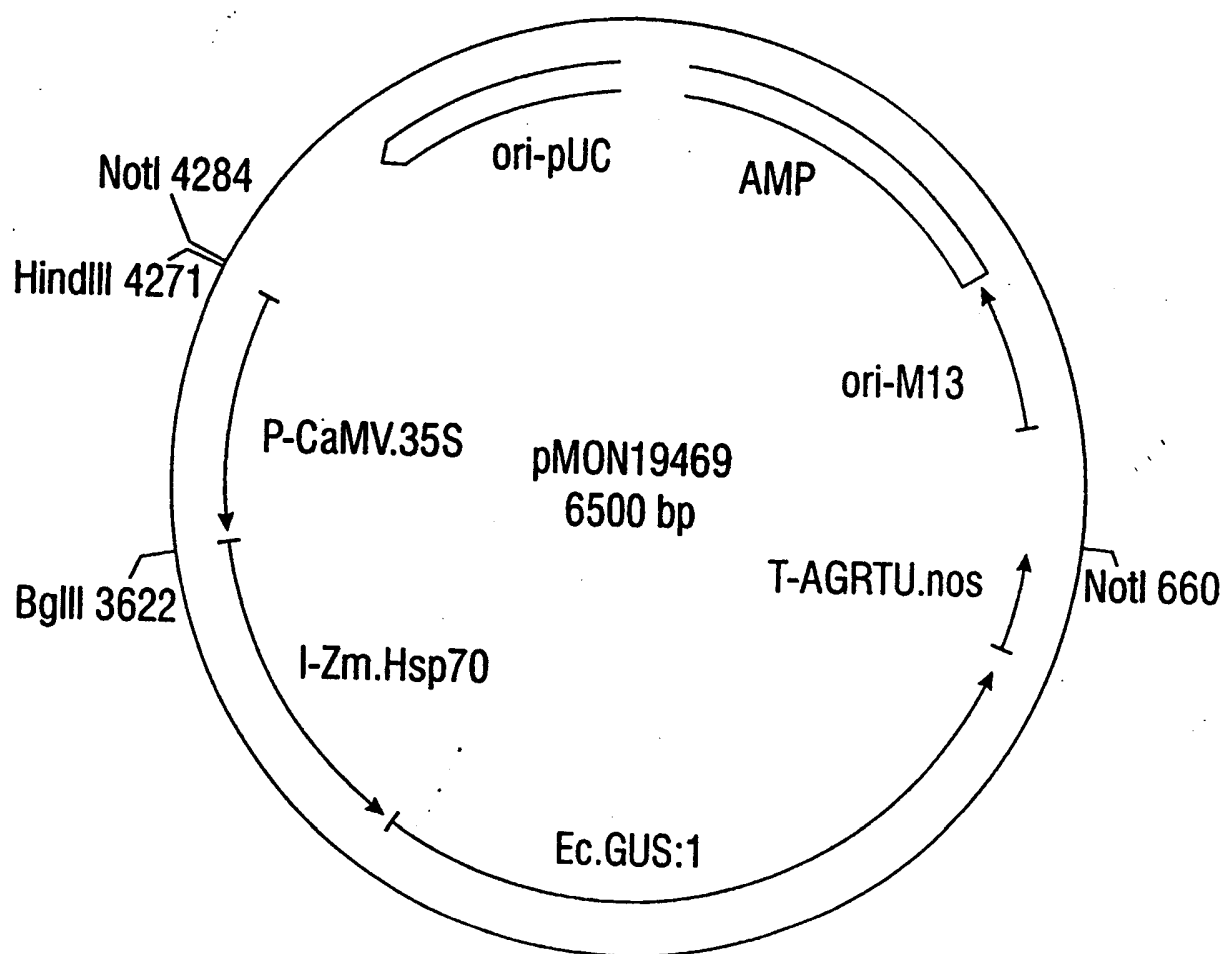
Způsoby techniky pro konstrukci expresivních vektorů, které obsahují genetickým inženýrstvím nově vytvořené 5' regulační elementy, jsou odborníkům dobře známy. Vytvořené promotory se testují v expresivních vektorech a transientně se zkoumají operativním vázáním nových promotorů ke vhodnému reporter genu, jako je GUS a zkoumají se v transientní rostlinné zkoušce. Nové promotory se operativně naváží na jeden nebo více genů našeho zájmu a zapojí se do rostlinného transformačního vektoru spolu s jedním nebo více dalšími regulačními elementy a transformují se do cílové rostliny našeho zájmu pomocí vhodného systému dodávky DNA. Stabilně transformované rostliny a následující potomstvo se zkoumají několika molekulárními, imunodiagnostickými, biochemickými, fenotypickými nebo agronomickými způsoby pro zjištění požadovaných agronomických charakteristik.

Odborníkům by mělo být po této ilustraci a popisu principů vynálezu zřejmé, že uspořádání a detaily vynálezu mohou být modifikovány bez odklonění od principů vynálezu. Činíme si nárok na veškeré modifikace, které se týkají smyslu a rozsahu přiložených patentových nároků.

Všechny citované publikace a publikované patentové dokumenty v tomto popisu jsou pomocí odkazů přiloženy v celé délce tak, jako by byla jednotlivá publikace nebo patentová přihláška specificky a jednotlivě přiložena.

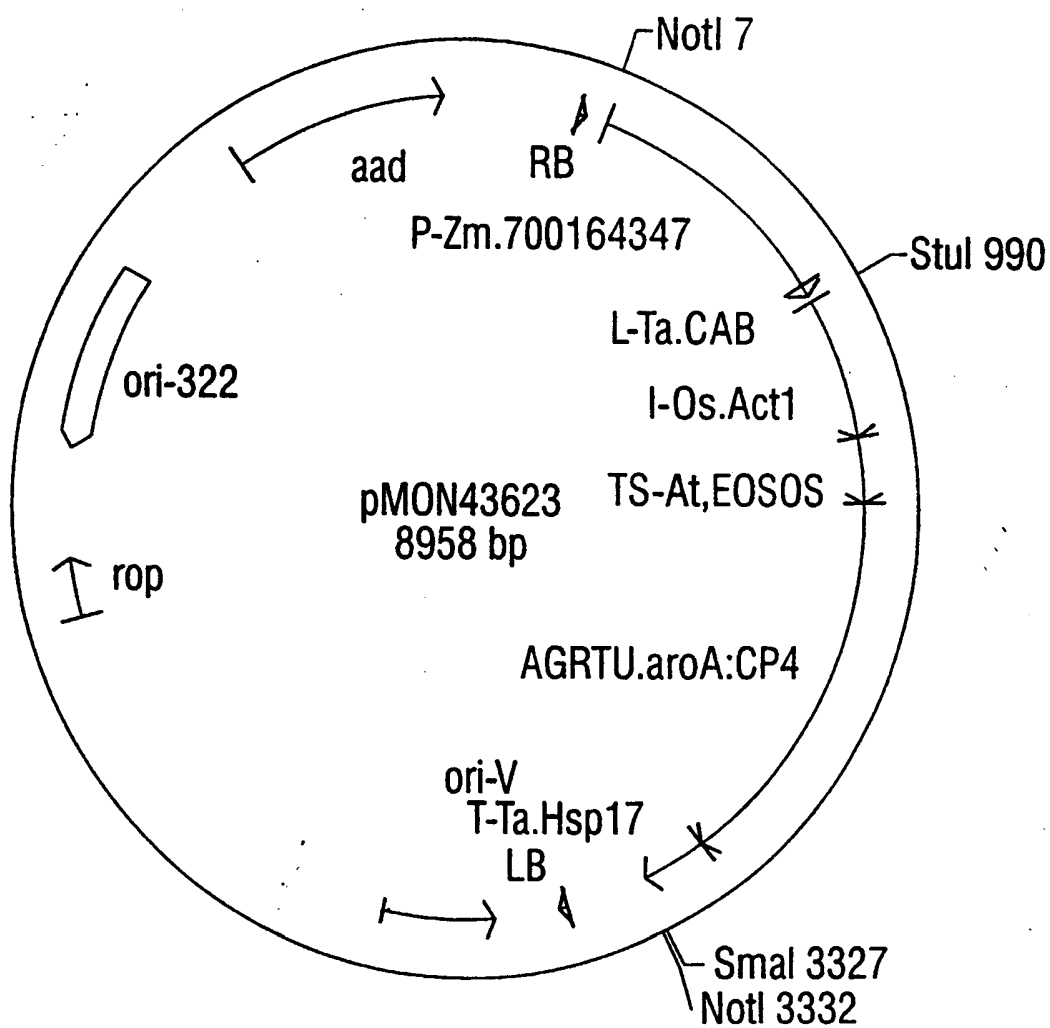
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaná molekula DNA obsahující polynukleotid vybraný ze skupiny sestávající ze sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo z jejich fragmentu, který má alespoň 20 nukleotidů.
2. Izolovaná molekula DNA podle nároku 1, která dále obsahuje druhou polynukleotidovou molekulu navázanou k molekule DNA, jak je definována v nároku 1.
3. Izolovaná molekula DNA podle nároku 2, kde polynukleotid umožňuje expresi druhé polynukleotidové molekuly v tkáni transgenní rostliny.
4. Izolovaná molekula DNA podle nároku 2, kde polynukleotid je hybridní promotor.
5. Izolovaná molekula DNA podle nároku 4, která dále obsahuje minimální promotorovou sekvenci.
6. Izolovaný konstrukt DNA obsahující izolovaný polynukleotid vybraný ze skupiny sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo z jejich fragmentu, který má alespoň 20 nukleotidů, přičemž izolovaný konstrukt DNA je operativně navázán na druhý polynukleotid a 3' nepřeloženou oblast.
7. Transgenní rostlina nebo rostlinná buňka, vyznačující se tím, že obsahuje izolovaný konstrukt DNA podle nároku 6.
8. Transgenní rostlina podle nároku 7, vyznačující se tím, že je to jednoděložná rostlina.
9. Transgenní rostlina podle nároku 7, vyznačující se tím, že konstrukt DNA dodává rostlině herbicidní toleranci.
10. Způsob tvorby transgenní rostliny, vyznačující se tím, že se zavede konstrukt DNA do rostlinné buňky, přičemž konstrukt obsahuje (a) promotor obsahující polynukleotid vybraný ze skupiny sekvencí SEKV. ID. Č.: 53-75 nebo jejich fragmentu, který má alespoň 20 nukleotidů, přičemž promotor je operativně navázán na (b) druhý polynukleotid a (c) 3' nepřeloženou oblast; vybere se rostlinná buňka a regeneruje se rostlinná buňka do rostliny.
11. Způsob tvorby transgenní rostliny, vyznačující se tím, že se zavede konstrukt DNA do rostlinné buňky, přičemž konstrukt obsahuje (a) CaMV-35S promotor, přičemž promotor je operativně navázán na (b) intron rýžového aktinu, (c) druhý polynukleotid a (d) 3' nepřeloženou oblast; vybere se rostlinná buňka a regeneruje se rostlinná buňka do rostliny.



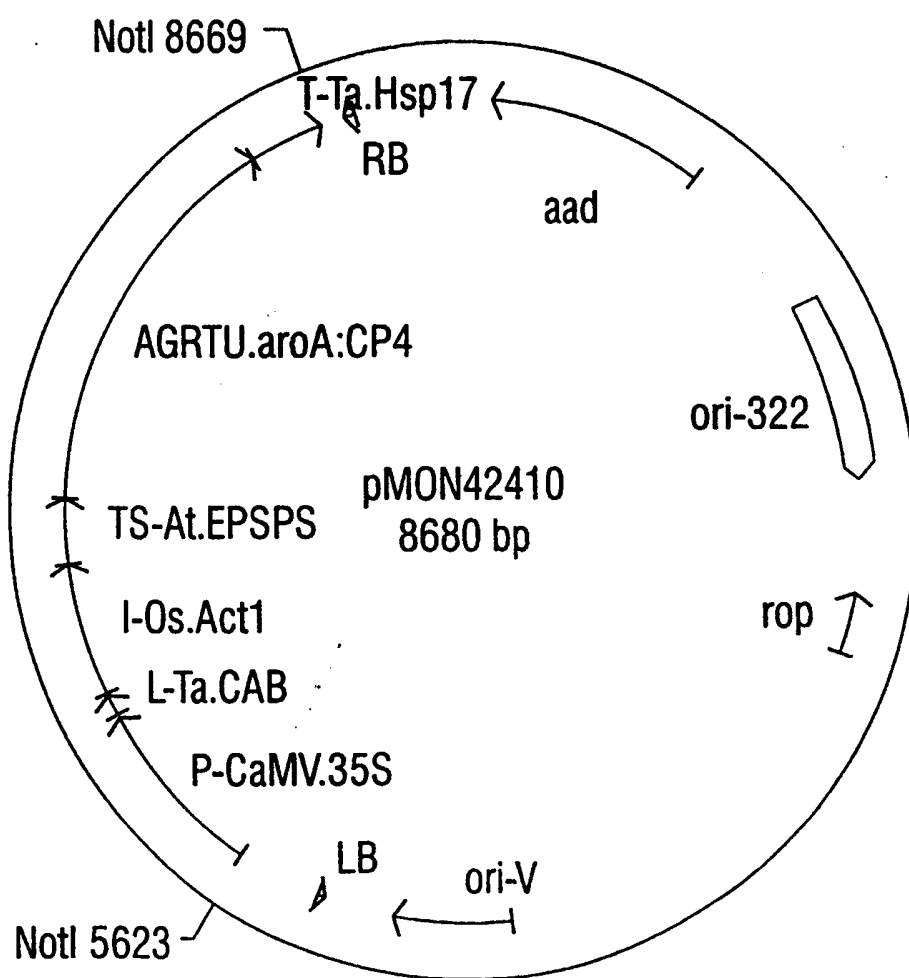
Obr. 1

2/14



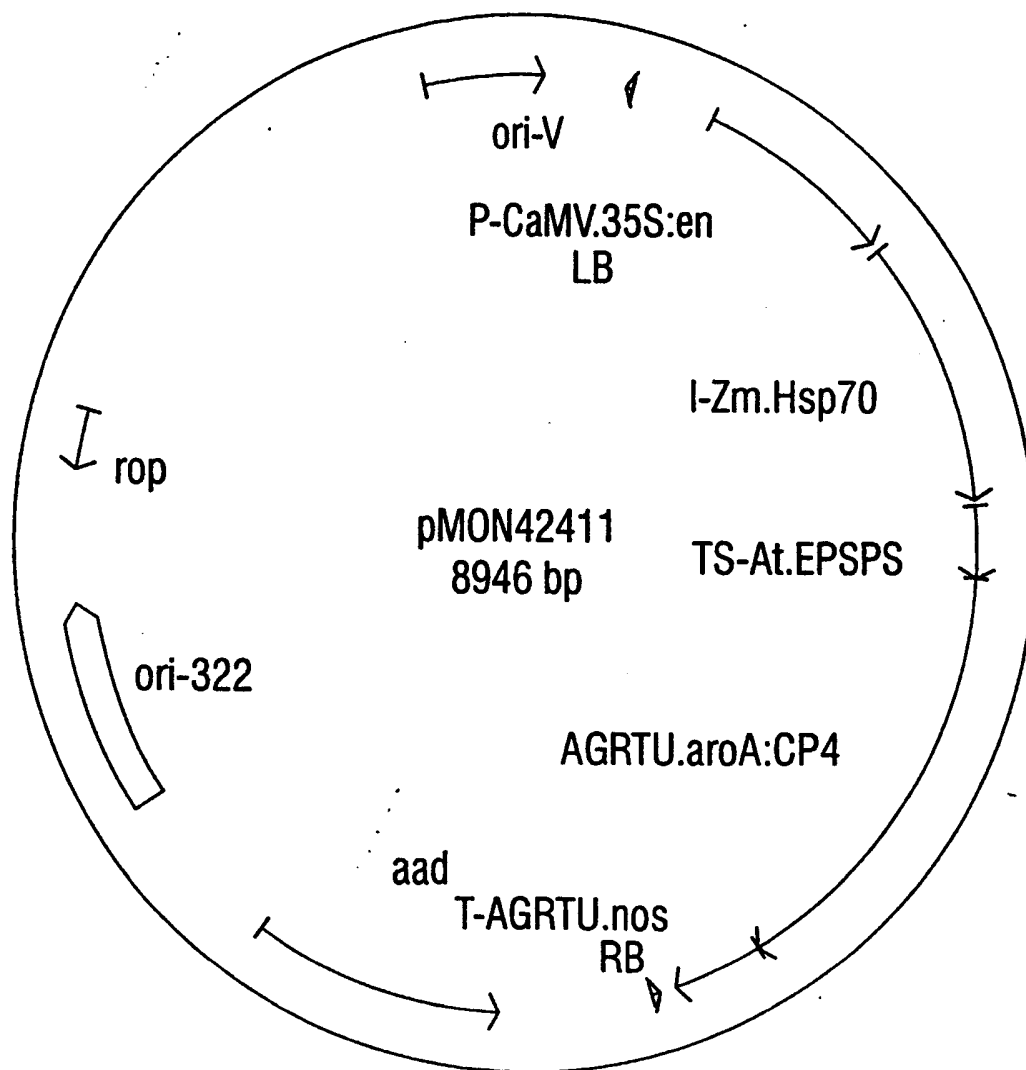
Obr. 2

3/14



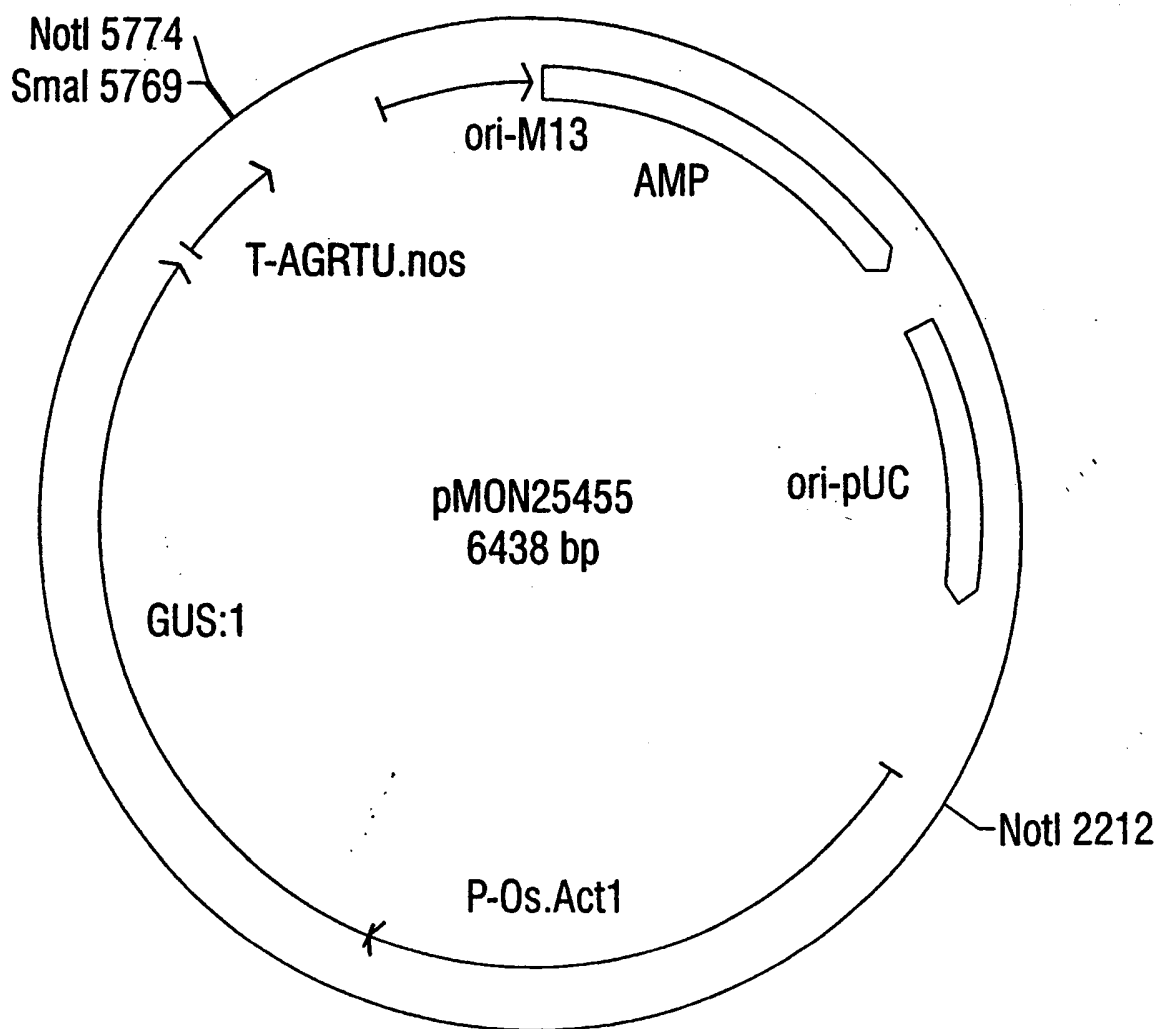
Obr. 3

4/14



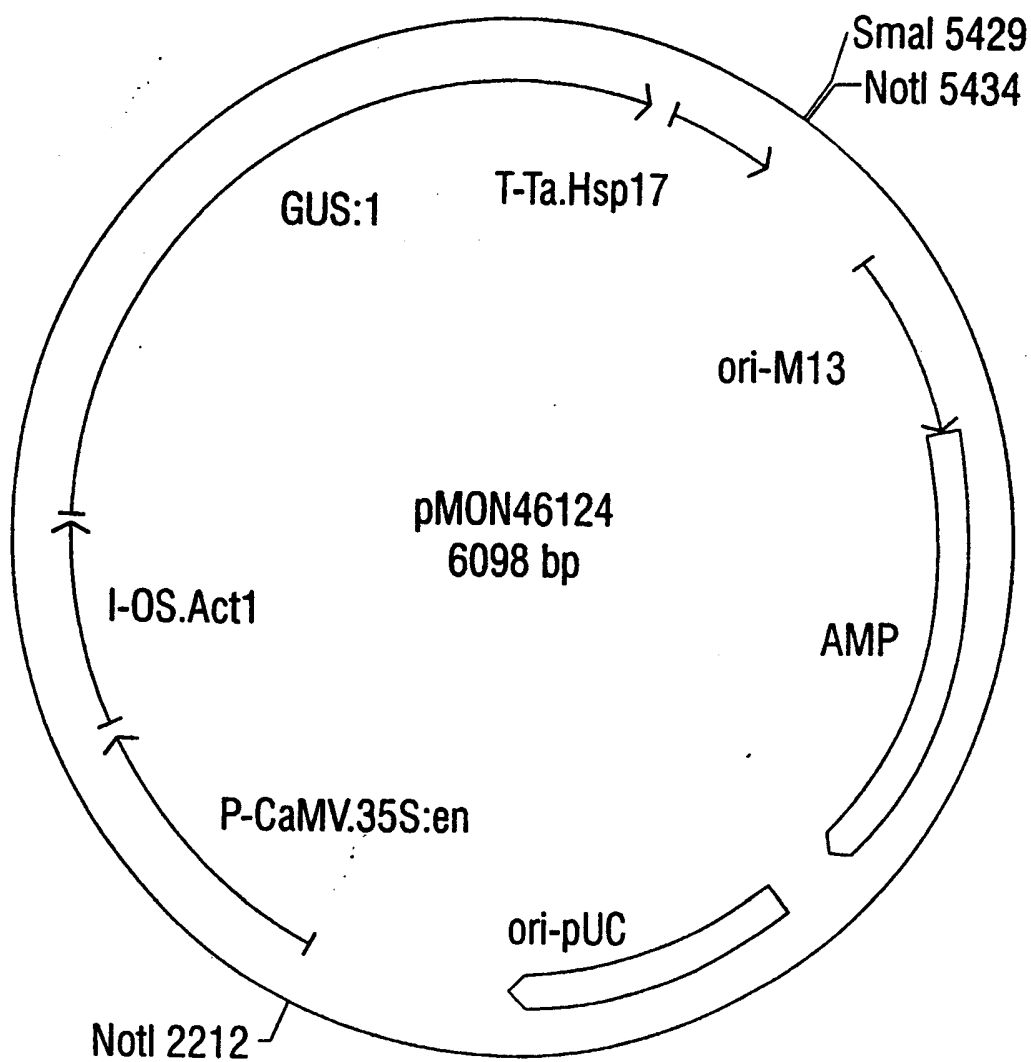
Obr. 4

5/14



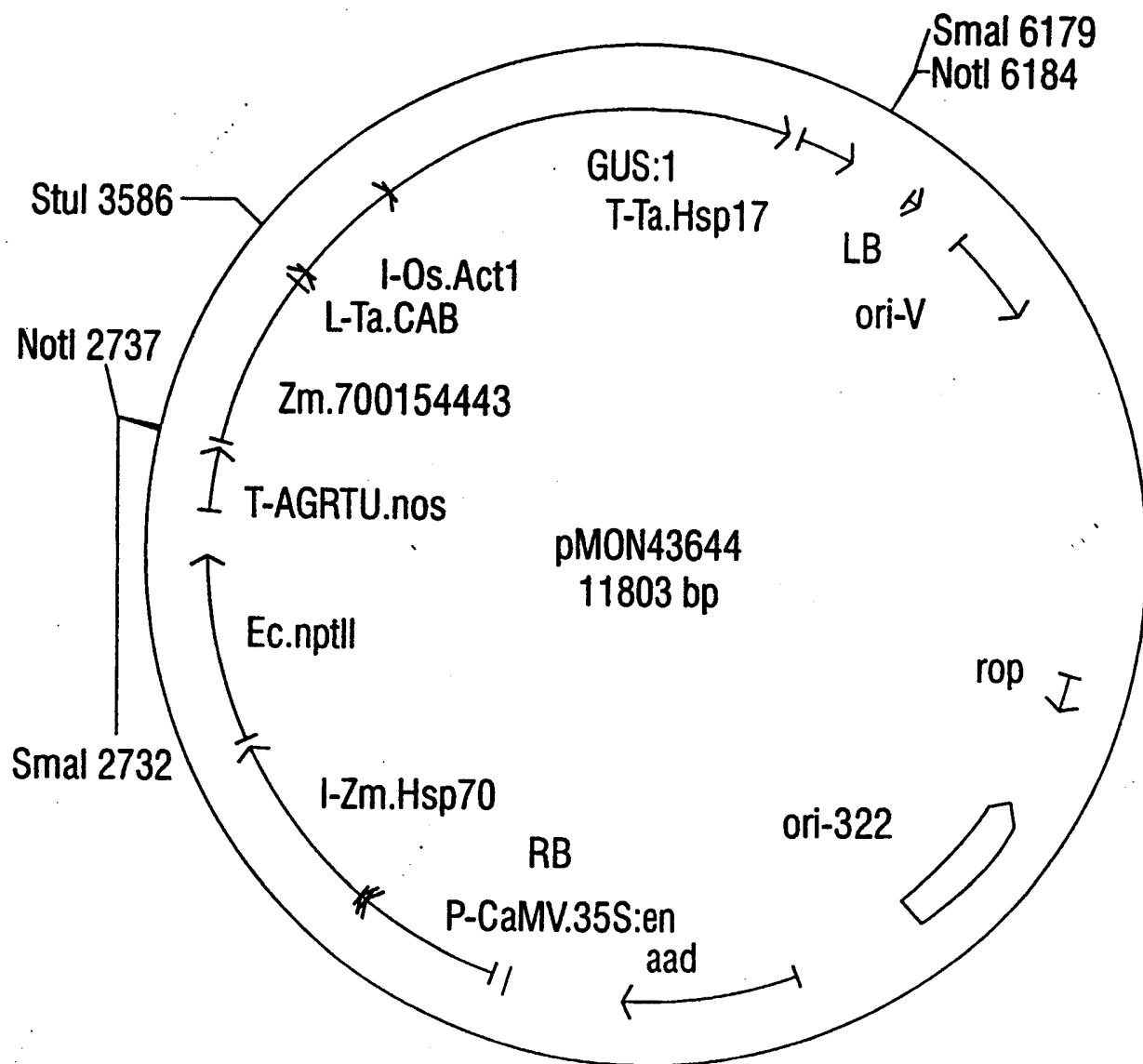
Obr. 5

6/14



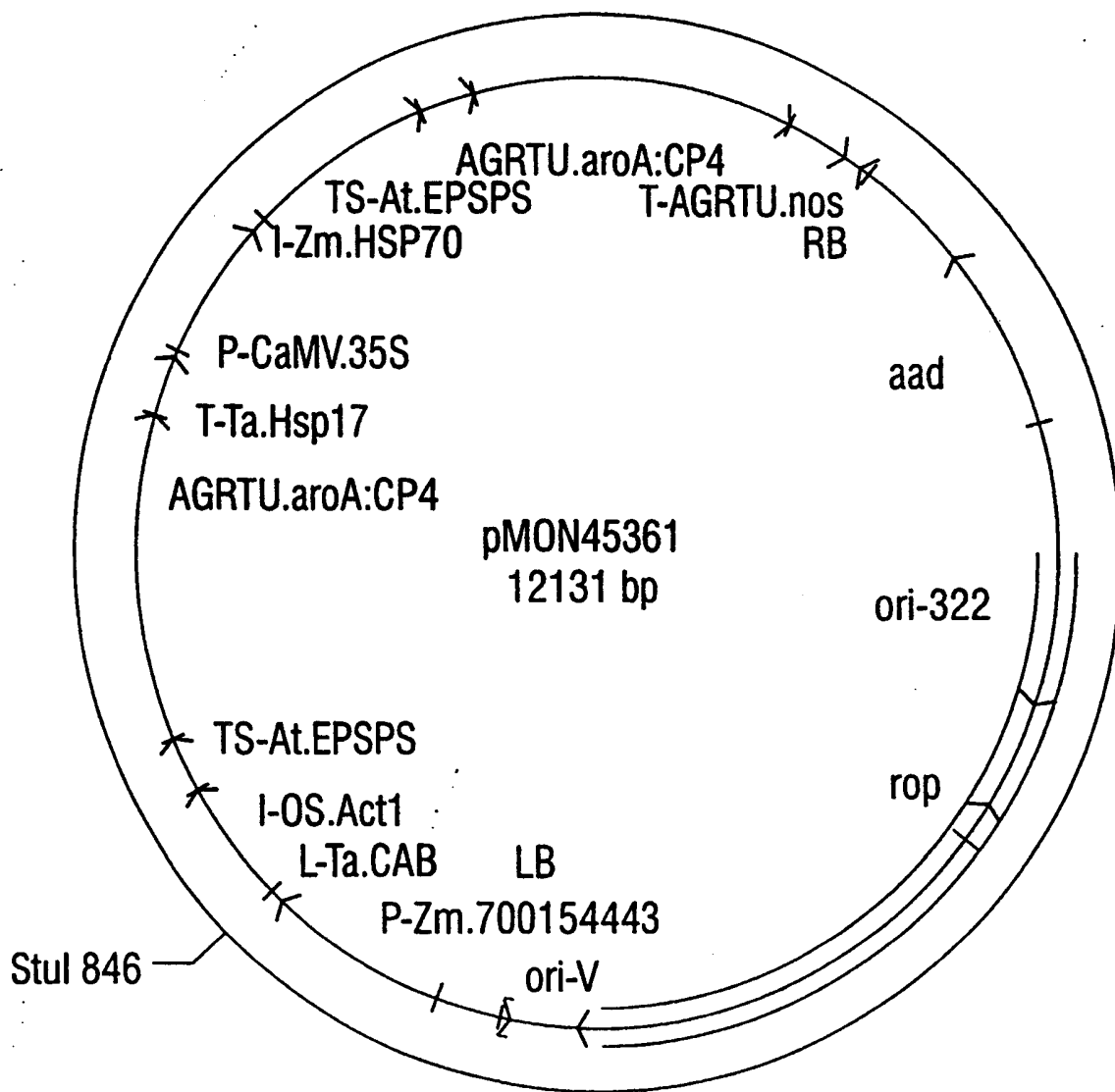
Obr. 6

7/14



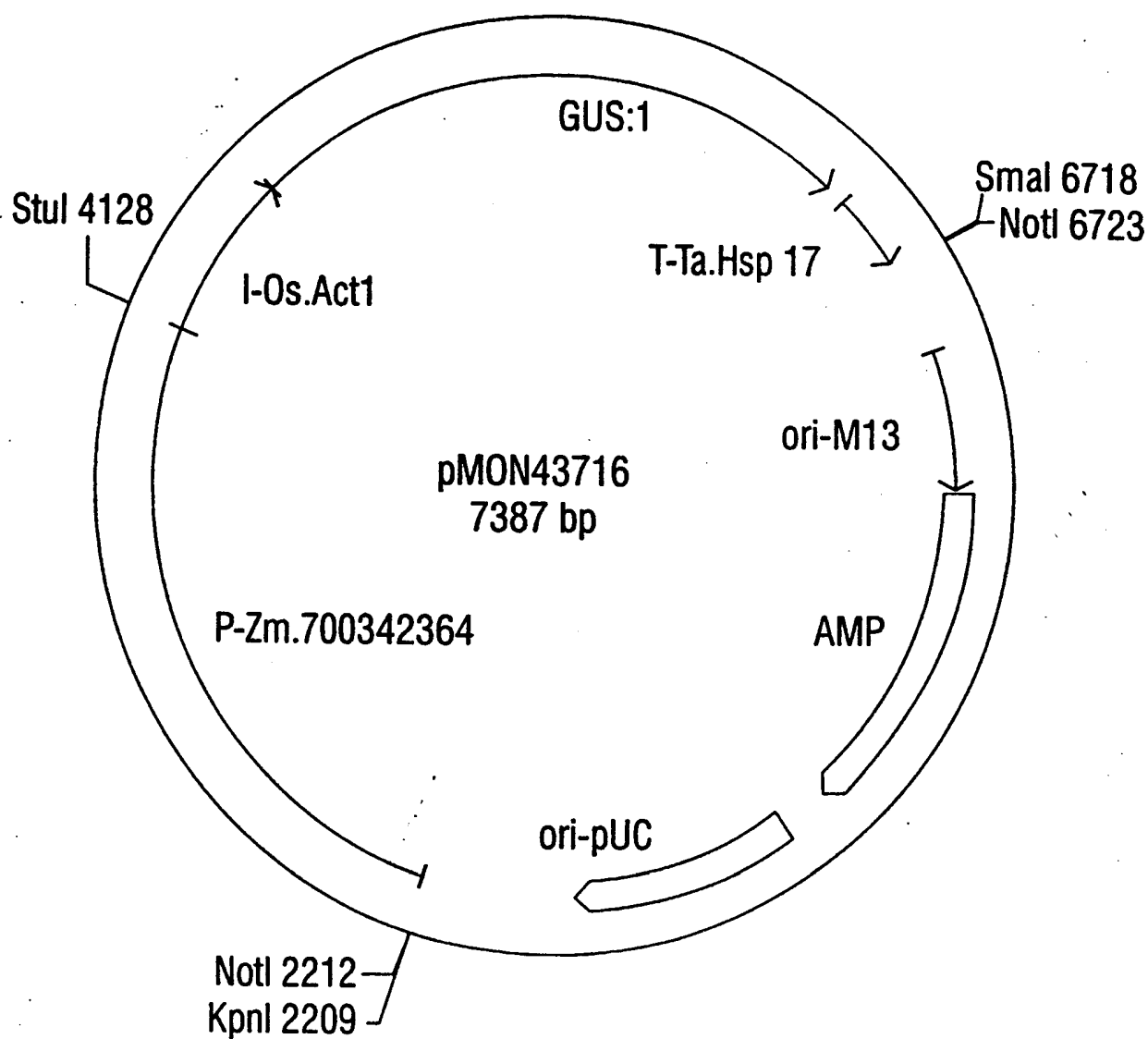
Obr. 7

8/14



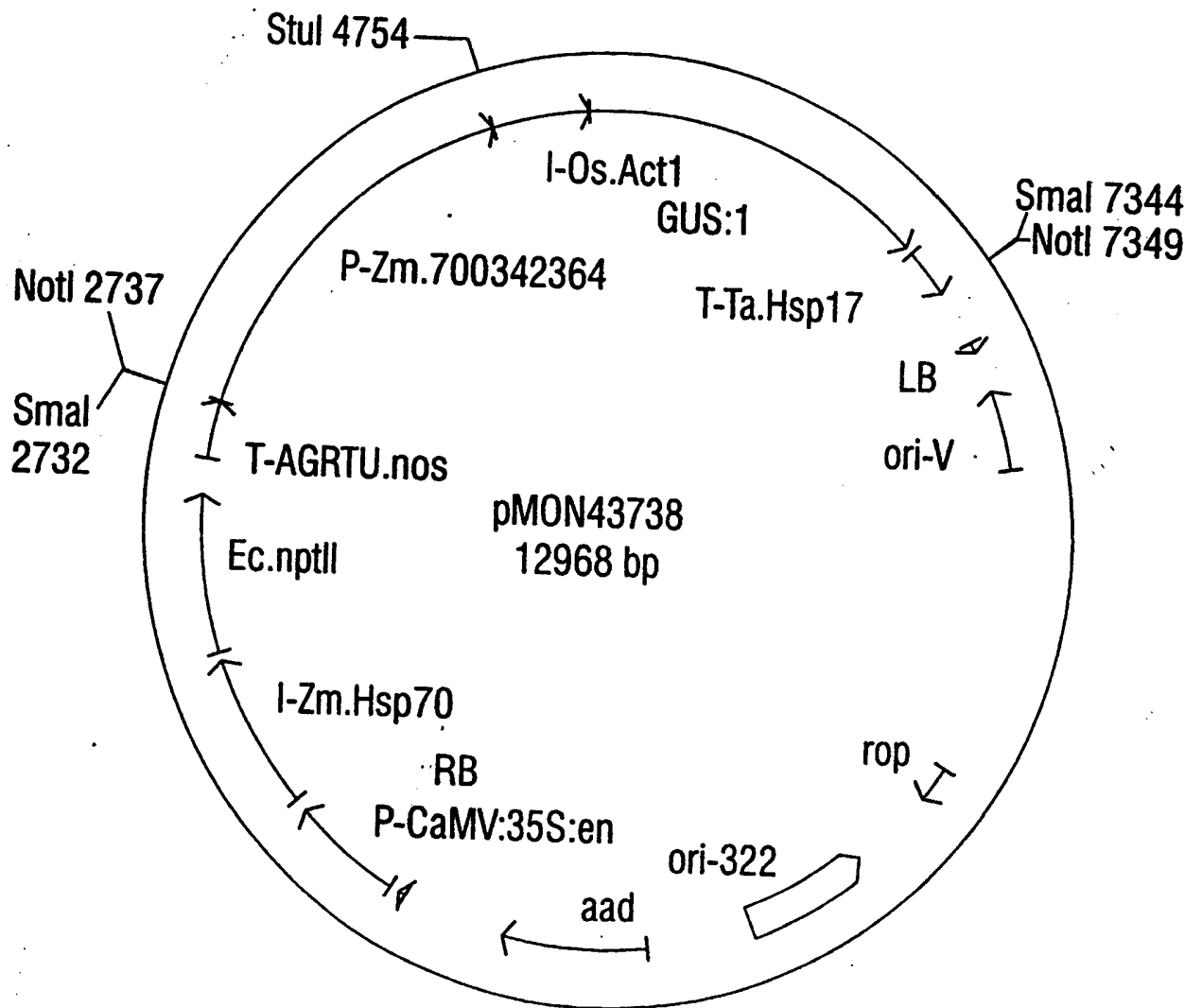
Obr. 8

9/14



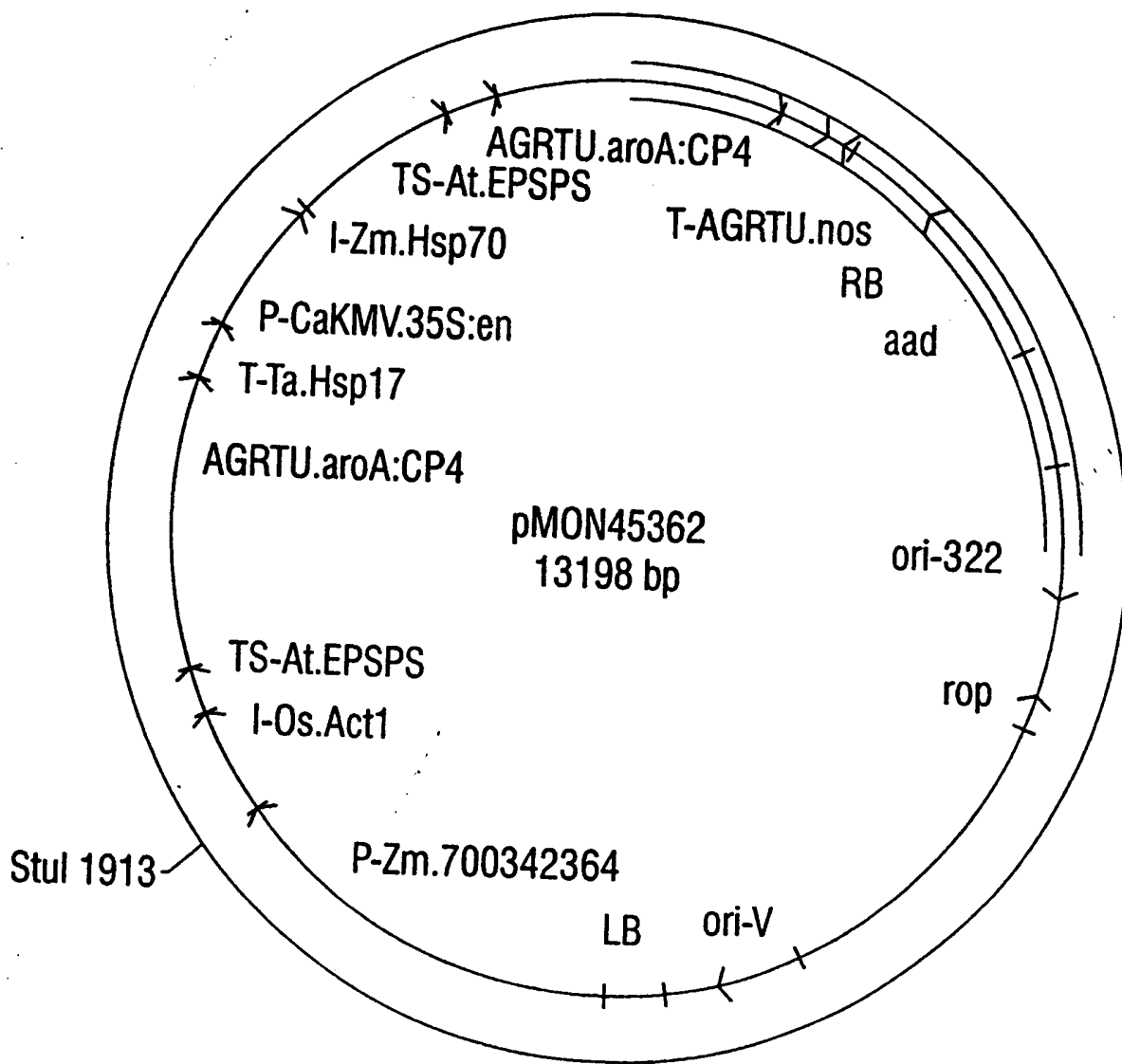
Obr. 9

10/14



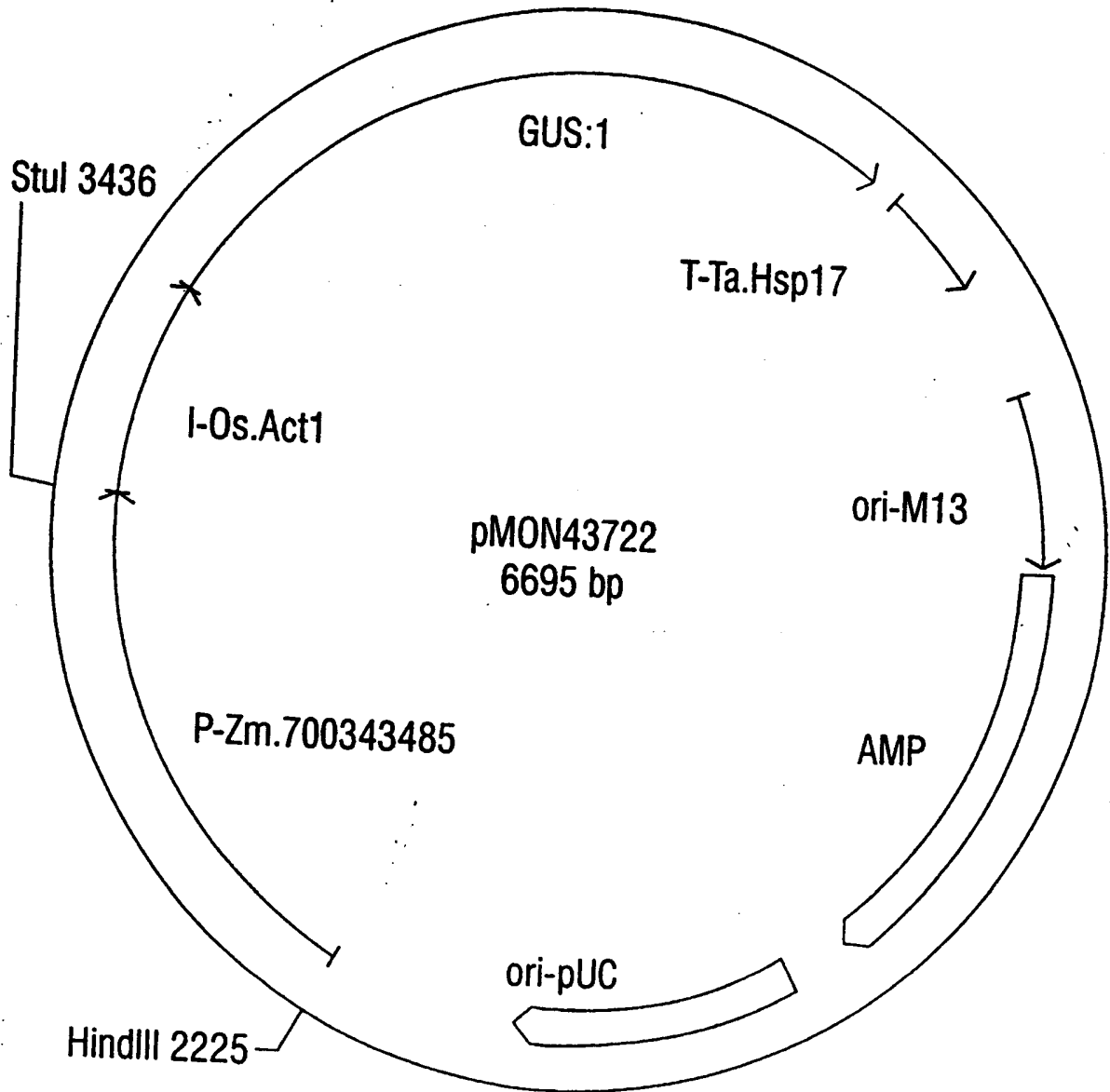
Obr. 10

11/14

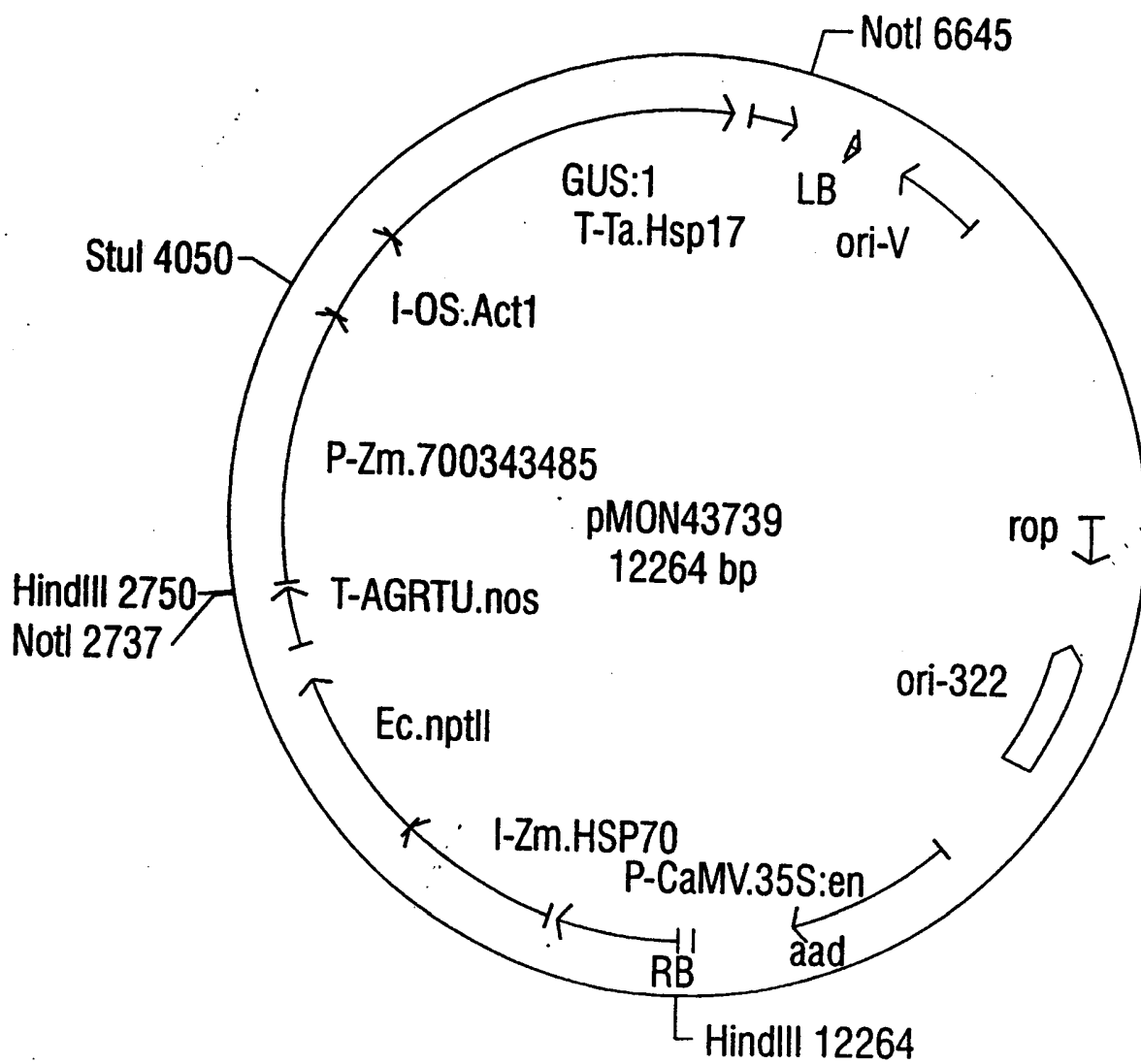


Obr. 11

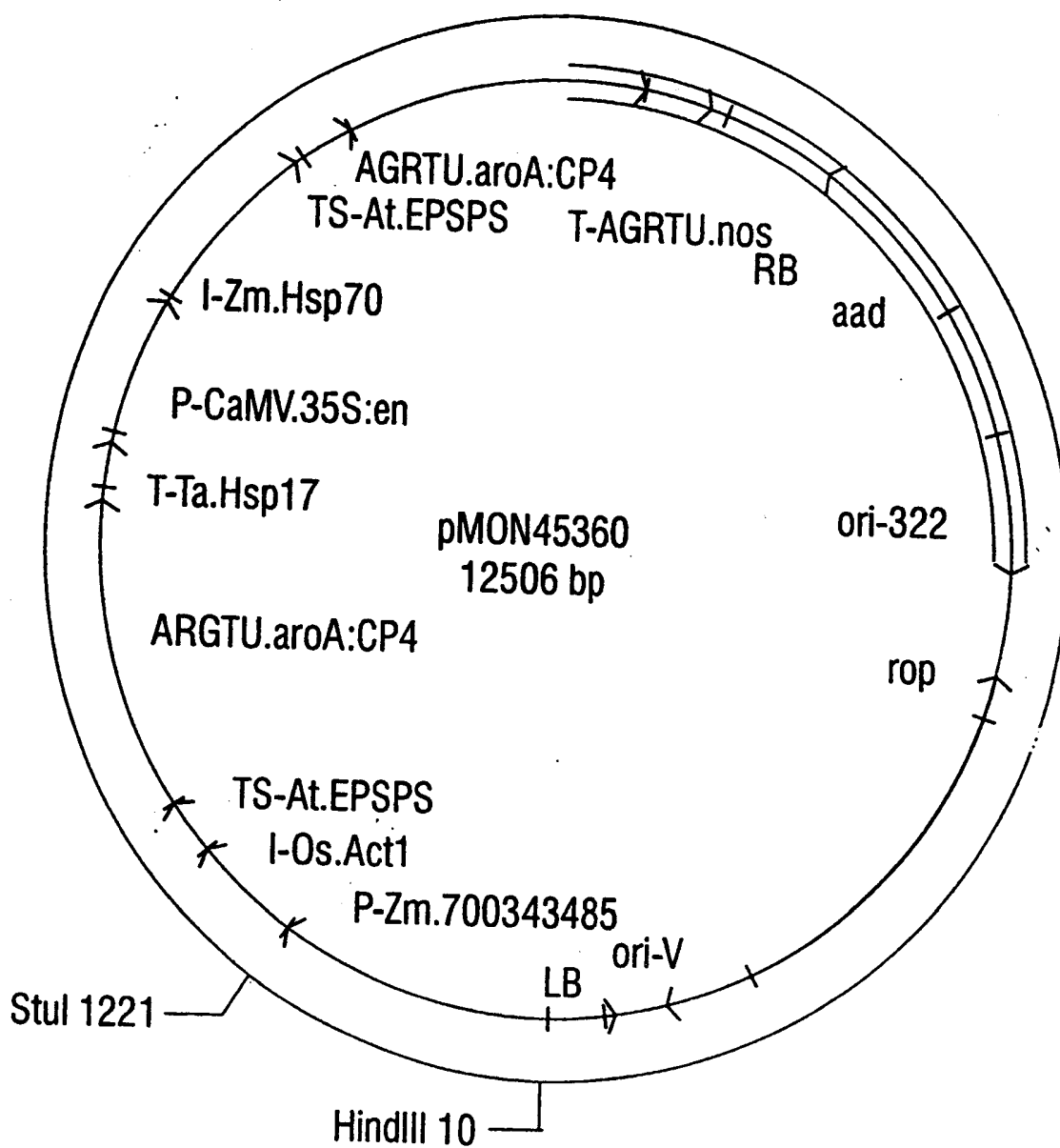
12/14



Obr. 12



Obr. 13



Obr. 14