



H U 0 0 0 2 1 8 8 2 4 B

(19) Országkód

HU**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG****MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL****SZABADALMI
LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

218 824 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 01792
(22) A bejelentés napja: 1991. 12. 20.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
90/04096 1990. 12. 21. SE
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/SE 91/00892
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/11376

(51) Int. Cl.⁷**C 12 N 15/56**

C 12 N 9/42

A 01 H 5/00

(40) A közzététel napja: 1994. 12. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 12. 28.

(72) Feltalálók:

Hofvander, Per, Falsterbo (SE)
Persson, Per T., Kristianstad (SE)
Tallberg, Anneli, Lund (SE)
Wikström, Olle, Kristianstad (SE)

(73) Szabadalmaz:

Amylogene HB, Svalöv (SE)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,
Budapest

(54) **A burgonya génebeszeti módosítása amilopektin típusú keményítő
képzése céljából**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás a burgonyában való amilóz-képződés gátlására burgonya génebeszeti úton történő módosításával úgy, hogy a genomba szemcsekötött keményítőszintetáz képződéséért felelős gén egy fragmentumát vagy annak komplementerével sztringes körülmények között hibridizálni képes szekvenciát juttatnak be antiszensz irányban. A találmány tárgyát képezik az antiszensz fragmentumokat és CaMV 35S, patatin I

vagy GBSS promotert tartalmazó antiszensz konstrukciók, gének és vektorok, a szemcsekötött keményítőszintetáz termelődését kódoló gén promotere és maga a gén is, továbbá az antiszensz fragmentumokat tartalmazó burgonyasejtek, növények, gumók, mikrogumók, valamint eljárások természetes amilopektin típusú keményítő és ennek származékai előállítására.

HU 218 824 B

A találmány tárgya eljárás a burgonyában való amilóz-képződés gátlására burgonya génebézési úton történő módosításával, úgy, hogy a genomba szemcsekötött keményítőszintetáz képződéséért felelős gén egy fragmensét vagy annak komplementerével sztringes körülmények között hibridizálni képes szekvenciát juttatunk be antiszensz irányban. A találmány tárgyát képezik az antiszensz fragmentumok és CaMV 35S, patatin I vagy GBSS promotert tartalmazó antiszensz konstrukciók, gének és vektorok, a szemcsekötött keményítőszintetáz termelődését kódoló gén promotere és maga a gén is, továbbá az antiszensz fragmentumokat tartalmazó burgonyasejtek, növények, gumók, mikrogumók, valamint eljárások természetes amilopektin típusú keményítő és ennek származékai előállítására.

A találmány szerint burgonya génebézési módosításának eredményeképpen a burgonyában gyakorlatilag szinte csak amilopektin típusú keményítő képződik. A génebézési módosítás génfragmentumok burgonyába való bejuttatását jelenti, ahol a génfragmentumok vezetőszekvencia, translációkezdő és translációvég és zárószekvencia részekből, valamint a szemcsekötött keményítőszintetáz gén kódoló és nem kódoló (azaz exonok és intronok) részeiből áll antiszensz irányban inzertálva.

A keményítő számos formájában nagy jelentőséggel bír az élelmiszer- és papíriparban. A jövőben a keményítőnek fontos szerepe lehet természetes úton lebontható polimerok termelésében is, például csomagolóanyagként való felhasználásában. Sok különféle keményítőtermék ismert, melyeket többek közt a kukoricából és burgonyából származó természetes keményítő leszármaztatásával állítanak elő. A burgonyából és kukoricából származó keményítő a legtöbb a piacon versenyképes.

A burgonyagumó szárazanyag-tartalmának legnagyobb része keményítő. A burgonyakeményítő körülbelül 1/4–1/5 része amilóz, míg a maradék rész amilopektin. A keményítő ezen két komponensének más és más a felhasználási területe, ezért a tiszta amilóz vagy tiszta amilopektin előállításának lehetősége nagyon érdekes kérdés. A két keményítőkomponens előállítható azonos keményítőből is, de ez számos reakciólépést igényel, következésképpen drága és bonyolult.

Bebizonyítottuk, hogy lehetséges a burgonyát génebézési úton úgy módosítani, hogy a gumók nagymértékben csak az egyik vagy a másik típusú keményítőt termeljék. Ennek eredményeképpen napjainkban általánosan még nem alkalmazó területeken is piacképes lehet. Az ilyen génebézési úton módosított burgonyából származó keményítőnek élelmiszer-adalékként való felhasználása nagymértékű lehet, mivel semmilyen módosító folyamatnak nem lett kitéve.

Keményítőszintézis

A keményítőszintézist és annak szabályozását napjainkban nagy érdeklődéssel tanulmányozzák az alap kutatás szintjén és az ipari alkalmazás szintjén is. Bár sokat tudunk a szacharóz keményítővé való átalakításában részt vevő enzimekről, a keményítő bioszintézisét még nem fejtették meg. A kutatásokat főleg kukoricában vé-

gezve lehetővé vált azonban részben tisztázni a szintézisutakat és az azokban a reakciókban részt vevő enzimeket. A legfőbb keményítőszintetizáló enzim keményítőszemcsék termelésében a keményítőszintetáz és a láncelágazásokat végző enzim. Kukoricában eddig a keményítőszintetáz három formáját mutatták ki és vizsgálták. Ebből kettő oldható, a harmadik oldhatatlan és a keményítőszemcsékkel asszociált. Az elágazásokat végző enzim szintén három formája ismert, melyeket feltehetően három különböző gén kódol (Mac Donald & Preiss, 1985; Preiss, 1988).

A kukorica „viaszos” génje

A keményítő amilózkomponensének szintézise elsősorban a keményítőszintetáz α -1,4-D-glükán-4- α -glükózil-transzferáz (EC2.4.1.21) működése révén következik be, mely a sejt keményítőszemcséivel asszociált. Ezt a szemcsekötött enzimet kódoló gént viaszos (=wx⁺) génnek, míg az enzimet GBSS szemcsekötött keményítőszintetáznak nevezik.

A kukorica „viaszos” génjét genetikailag és biokémiai alapon jellemezték. A 9. kromoszóma viaszos génje szabályozza az amilóztermelést az endospermiumban, a pollenben és az embriósákban. WX alléllal rendelkező normál kukorica endospermiumában keletkező keményítő 25% amilózt és 75% amilopektint tartalmaz. Egy mutáns kukorica endospermiumában mutációt mutattak ki a wx⁺ génben és ezért funkcióképtelen GBSS szintetizálódik. Így ezen mutáns kukorica endospermiuma csak amilopektint tartalmaz keményítőkomponensként. Ez az úgynevezett „viaszos” mutáns sem GBSS enzimet, sem amilózt nem tartalmaz (Echt and Schwartz, 1981).

A GBSS fehérjét a wx⁺ kódolja a sejtmagban, de ez az amiloplasztba szállítódik és aktiválódik. Az előfehérje így két komponensből áll: egy 7 kD molekulatömegű szállító peptidből, mely a fehérjét az amiloplaszt membránon viszi keresztül, és egy 58 kD valódi fehérjéből.

A wx⁺ gén kódolászakasa kukoricában 3,7 kb hosszúságú és 14 exont és 13 intront tartalmaz. Számos szabályozószignált ismerünk a promoterrégióban és két különböző poliadenináló (poli A)-szekvenciát írtak le (Klößen és munkatársai, 1986; Schwartz-Sommer és munkatársai, 1984; Shure és munkatársai, 1983).

A burgonyaamilóz enzime

A burgonyában egy 60 kD molekulatömegű fehérjét azonosítottak a szemcsekötött fehérje fő részeként. Mivel ezen burgonyaenzim elleni antitestek keresztreakálnak a kukoricából származó GBSS-sel, feltételezik, hogy ez egy szemcsekötött szintetáz (Wos-Scheperkeuter és munkatársai, 1986). A burgonya GBSS enzim génjét azonban eddig nem jellemezték a kukorica viaszos génjéhez hasonló mértékben sem az elhelyezkedése, sem a szerkezete tekintetében.

Természetben előforduló viaszos mutánsokat írtak le a kukorica mellett árpa, rizs és cirok esetében is. Burgonya esetén természetes mutánsokat nem találtak, de egy monohaploid (n=12) növény leveleinek röntgenbesugárzásával előállítottak egy mutánst (Visser és munkatársai, 1987). Ezen mutáns gumóiból izolált keményí-

tő nem tartalmaz GBSS fehérjét vagy amilózt. A mutáns egy recesszív gén állapota jellemzi és amf-nek nevezik. Más növényfajok viaszos mutánsaihoz hasonlítható, mivel a GBSS fehérjét és az amilózt nem tartalmazza. A kromoszómaszám stabilitása azonban csökkent, hiszen a természetes szám négyszeresét ($n=48$) tartalmazza, mely negatív hatása a burgonyanövényekre (Jacobsen és munkatársai, 1990).

Az amilóztermelés gátlása

Az amilóz szintézise nagymértékben csökkenthető a szemcsekötött keményítőszintetáz, a GBSS gátlásával, mely az amilóz képződését katalizálja. Ez a gátlás a keményítőben főleg amilopektint eredményez.

Az enzimképződés gátlása számos módon végezhető: például

- mutagénnel való kezeléssel, amely az enzim képződését kódoló génszekvencia módosítását eredményezi,
- az enzimet kódoló génszekvenciában transzpozon bejuttatásával,
- génszűrés útján történő módosítással oly módon, hogy az enzimet kódoló gén expresszáldjon, például antiszenszgén-inhibícióval.

Az 1. ábra a normál génexpresszió specifikus gátlását mutatja, melyben a célpont gén mRNS-ét egy komplexen antiszensz nukleotiddal hibridizálják. Az antiszensz nukleotid így egy antiszensz RNS, mely egy fordított génszekvenciából íródott át in vivo (Izant, 1989).

Az antiszensz technika alkalmazásával különböző növényi gének működését már gátolták. A kalcium-szintetáz a poligalakturonáz és a foszfinotricin-acetil-transzferáz antiszensz konstrukcióját használták a megfelelő növényi enzimek gátlására petúniában, paradicsomban és dohányban.

Az amilóz gátlása burgonyában

Burgonyában a szemcsekötött keményítőszintetáz (GBSS fehérje) szintézisének gátlására különböző kísérleteket már folytattak a GBSS-t kódoló génnek megfelelő antiszensz konstrukcióval (ezt a gént ezután GBSS génnek nevezzük). Hergersberger (1988) egy olyan eljárást mutat be, mellyel a GBSS gén egy cDNS-klónját izolálta burgonyában a kukorica wx^+ gén cDNS-klónjának felhasználásával. A teljes cDNS-klónon alapuló antiszensz konstrukciót burgonyalevél korongokra vitte át *Agrobacterium tumefaciens* segítségével. A regenerált burgonyacsírából in vitro indukált mikrogumókban az amilóztartalom változó és nagyon gyenge csökkenését figyelték meg és egy diagramban mutatták be. A GBSS gén teljes jellemzését nem közölték.

A burgonya GBSS fehérjégénjét tovább jellemezték azáltal, hogy egy wx^+ genom klónt restriktionsanalízissel vizsgálták. A klón DNS-szekvenciáját azonban nem határozták meg (Visser és munkatársai, 1989).

A burgonya GBSS génjének megfelelő antiszensz konstrukcióval végzett további kísérletekről is beszámoltak.

Az antiszensz konstrukciót, amely egy cDNS-klónon alapult, a CaMV 35S promoterral együtt *Agrobacterium rhizogenes* alkalmazásával transzformálták. A kapott információk szerint a transzformálás a burgonya ala-

csnyabb amilóztartalmát eredményezte, de mért értéket nem hoztak nyilvánosságra (Flavell, 1990). Az eddig burgonya genetikai módosítására használt eljárások egyike sem eredményezett gyakorlatilag egyáltalán nem amilóz típusú keményítőt. A találmány szerinti megoldással célunk tehát az volt, hogy a burgonyagumókban az amilóz keletkezésének gyakorlatilag teljes szuppresszióját érjük el.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmány szerinti megoldást.

A találmány szerinti megoldásban a GBSS-gén működését és ezáltal a burgonyában az amilóz keletkezését gátoljuk teljesen új antiszensz konstrukciók alkalmazásával. A találmány szerinti antiszensz fragmensek kialakításához a genomi eredetű GBSS-gént vettük kiindulási alapul, hogy a GBSS-t és, következésképpen, az amilóztermelés lehető leghatékonyabb gátlását érjük el. A találmány szerinti antiszensz konstrukciók a GBSS-gén kódoló és nem kódoló részeit egyaránt tartalmazzák. Ezek a részek a génszekvencia olyan régióit foglalják magukban, mint a promotor, továbbá a vezető („leader”) szekvencia, a transzlációs iniciációs hely, a transzlációs terminációs hely és a zárószekvencia („trailer sequence”), antiszensz irányban. Szövetspecifikus expresszió megvalósítása érdekében, azaz annak érdekében, hogy az amilóztermelés gátlása csupán a burgonyagumókban következzen be, olyan promotereket alkalmazunk, amelyek specifikusan aktívak a burgonyagumóban. Ennek eredményeképpen a keményítő összetétele a növény egyéb részein nem változik, és így elkerüljük a nemkívánatos mellékhatásokat.

A találmány tárgyát képezi tehát egy fragmens, amely lényegében az 1., a 2. vagy a 3. azonosító számon megadott szekvenciák valamelyikét tartalmazza. A szekvenciák azonban eltérhetnek ezektől egy vagy több nem szomszédos bázispárban anélkül, hogy ez a fragmentumok működését befolyásolná.

A találmány további tárgya egy 987 bp hosszúságú burgonyagumó-specifikus promotor is, mely a találmány szerinti szemcsekötött keményítőszintetáz kódoló génhez tartozik. Eddig sem a promotert, sem a megfelelő gént nem jellemezték. A 987 bp hosszúságú promoterszekvenciát a 4. számú szekvenciában, míg a génszekvenciát az 5. számú szekvenciában közöljük. A promotor és a génszekvenciák is eltérhetnek ezektől egy vagy több nem szomszédos bázispárban anélkül, hogy funkciójuk változna.

A találmány további tárgyai olyan vektorok, melyek a találmány szerinti antiszensz fragmentumokat és antiszensz konstrukciókat tartalmaznak.

A találmány más vonatkozásai olyan sejtek, növények, gumók és magvak, melyek genomjai a találmány szerinti fragmentumokat tartalmazzák antiszensz irányban.

A találmány további vonatkozása natív amilopektin típusú keményítő és annak származékai.

Végül a találmány egy olyan, a burgonyában az amilóz képződését gátló eljárással foglalkozik, ami által főleg amilopektin típusú keményítő képződik a burgonyában.

A találmányt a továbbiakban részletesebben ismertetjük hivatkozva a kiegészítő ábrákra, ahol az

- az 1. ábra az antiszenszgén-inhibíció alapelvét mutatja be,
- a 2. ábra a burgonya GBSS gén restrikciós analízise eredményét mutatja be,
- a 3. ábra a pHo3 és pHo4 jelű új kettős vektort mutatja,
- a 4. ábra a pHoxwA, pHoxwB és pHoxwD antiszensz konstrukciókat mutatja,
- az 5. ábra a pHoxwF és pHoxwG antiszensz konstrukciókat,
- a 6. ábra a pHoxwK és pHoxwL antiszensz konstrukciókat mutatja.

Továbbá a találmány szerinti különböző DNS-fragmentumok szekvenciáit az 1., 2., 3., 4. és 5. számú szekvenciákban mutatjuk be. Egy vagy több nem szomszédos bázispárban néhány eltérés lehetséges.

Anyagok

A találmány gyakorlati megvalósítása során a következő anyagokat alkalmazzuk:

Baktériumtörzsek: E coli DH5alfa és DH5alfaF'IQ(BRL). E. coli JM 105 (Pharmacia). A. tumefaciens LBA4404 (Clontech).

Vektorok: M13mp18 és mp19 (Pharmacia). pBI101 és pBI121 (Clontech). pBI240.7 (M. W. Bevan). pUC plazmidok (Pharmacia).

Enzimek: Restrikciós enzimek és EcoRI kapcsoló enzim (BRL). UNION™ DNS-kapcsoló kit (Clontech). Sequenase™ DNS-szekvenáló kit (USB)T₄-DNS-ligáz (Pharmacia).

A fenti anyagokat a gyártó cégek útmutatásai szerint használjuk.

Génkönyvtár

A bejelentők megrendelésére a Clontech készítette a génkönyvtárat EMBL3-ban kiindulási anyagként Bintje burgonyaleveleket használva.

A GBSS gén azonosítása és izolálása

A génkönyvtárat a burgonya GBSS génjére vizsgáljuk a gén 5' és 3' végére specifikus cDNS-klónok segítségével (a fenti cDNS-klónokat M. Hergersberger, Max Plank Institute in Cologne-től származtak) a Clontech eljárása szerint.

A génkönyvtárból egy wx311 jelű, a burgonya teljes GBSS génjét tartalmazó klónt azonosítunk és izolálunk. A GBSS gén elejét egy EcoRI fragmentumnál határozzuk meg és w fragmentumnak nevezzük (3,95 kb). A GBSS gén végét szintén egy EcoRI fragmentumnál határozzuk meg, amit x fragmentumnak nevezzük (5,0 kb). Egy BgIII-SpeI fragmentumot is izolálunk és m fragmentumnak nevezzük (3,9 kb), mely tartalmaz a w és x fragmentumokkal azonos szekvenciákat. A w, m és x fragmentumokat pUC13-ban (Viera, 1982; Yanisch-Peron és munkatársai, 1985) klónozzuk tovább, és ezeket pSw, pSm és pSx-ként nevezzük el (2. ábra).

A burgonya GBSS génjének jellemzése

A burgonya GBSS génjét restrikciós analízissel és cDNS-próbákkal jellemezzük, amely során a GBSS gén 5' és 3' végeit pontosabban meghatározzuk (2. ábra).

A GBSS gén meghatározását Sanger és munkatársai, 1977 szerint végezzük a pSw és pSx alklónokon M13mp18-ban, mp19-ben és pUC19-ban az 5' vég környékéről indulva (lásd 5. számú szekvencia).

A promotorszakaszt a BgIII-NsiI fragmentumnál határozzuk meg (lásd a 4. számú szekvenciát). A transzkripció és transláció kezdetét egy átfedő BgIII-HindIII fragmentumnál határozzuk meg. Ezt követően a terminátorszakaszt egy SpeI-HindIII fragmentumnál határozzuk meg.

A burgonya GBSS génjének antiszensz konstrukciói

A találmány szerinti GBSS génfragmentumokat (lásd 1., 2., 3. és 4. számú szekvencia és 2. ábra) a következő módon határozzuk meg.

A pSw fragmentum NsiI és HindIII restrikciós enzimekkel való hasítása a I. fragmentumot (1. számú szekvencia) eredményezi, melyet pUC19-ben klónozzuk és 19NH₃5-nek nevezzük. A 19NH₃5 további hasítása HpaI-SstI-vel a találmány szerinti GBSS gén 342 bp-ját tartalmazó fragmentumát eredményezi. Ez a fragmentum a vezetőszekvenciából, a translációkezdő szekvenciából és a kódolószakasz első 125 bp-jából épül fel.

A pSm fragmentum HpaI és NsiI restrikciós enzimekkel való hasításával a II. fragmentumot (2. számú szekvencia) nyerjük, amit pJRD184-ban (Heusterspreute és munkatársai, 1987) klónozzuk és pJRDmitt-nek nevezzük. A pJRDmitt további hasítása HpaI-SstI-vel a találmány szerinti GBSS gén 2549 bp-ját tartalmazó fragmentumot eredményezi. Ez a fragmentum a gén közepéről származó exonokat és intronokat tartalmazza.

A pSx fragmentum SstI és SpeI restrikciós enzimekkel való hasítása a III. fragmentumot (3. számú szekvencia) eredményezi, amelyet pBluescriptban (Melton és munkatársai, 1984) klónozzuk és pBlue3'-nek nevezzük. A pBlue3' további hasítása BamHI-SstI-vel a találmány szerinti GBSS gén 492 bp-ját tartalmazó fragmentumot eredményezi. Ez a fragmentum az utolsó intront és exont, a translációbefejező szekvenciát és a zárószekvencia 278 bp-ját tartalmazza.

Antiszensz konstrukciók az I. fragmentummal (4. ábra)

A pHoxwA antiszensz konstrukció elkészítéséhez a 19NH₃5-ből a HpaI-SstI fragmentumot antiszensz irányban ültetjük be az SmaI-SstI-vel hasított pBI121 kettős vektorba (Jefferson és munkatársai, 1987). Az antiszensz fragmentum átírását CaMV 35S promoterral indítjuk és NOS terminátorral (NOS=nopalin-szintetáz) fejezzük be.

A pHoxwB antiszensz konstrukció előállítására céljából a 19NH₃5-ből származó HpaI-SstI fragmentumot antiszensz irányban SmaI-SstI-vel hasított pHo4 kettős vektorba (3. ábra) juttatjuk be. A burgonyagumó-specifikus patatin I promotor a pBI240.7 vektorból származik és M. Bevan, Institute of Plant Science Research, Norwich bocsátotta rendelkezésünkre. Az antiszensz fragmentum átírását patatin I promoterral indítjuk és NOS terminátorral fejezzük be.

A pHoxwD antiszensz konstrukció készítéséhez a 19NH₃5-ből származó HpaI-SstI fragmentumot antiszensz irányban SmaI-SstI-vel hasított pHo3 kettős vek-

torba (3. ábra) juttatjuk be. A pHo3 egy új kettős vektor, melyet a pBI101 alapján szerkesztünk. Ezt a vektort, mely az itt jellemzett burgonya GBSS gén találmány szerinti promotorét (lásd 4. számú szekvencia) (GBSS promotor) tartalmazza. SmaI és SstI restrikciós enzimekkel hasítjuk, a 19NH35-ből származó HpaI-SstI fragmentumot antiszensz irányban inzertáljuk. Az antiszensz fragmentum transzkripcióját ezután a saját GBSS promotorával indítjuk és az NOS terminátorral fejezzük be. Ez azt jelenti, hogy az antiszensz fragmentum csak a burgonyagumóban íródik át, mivel a GBSS promotor a patatin I promoterhez hasonlóan gumóspezifikus.

Az antiszensz konstrukciók a II. fragmentummal (5. ábra)

A pHoxwF antiszensz konstrukció készítésénél a pJRDmitt-ből származó HpaI-SstI fragmentumot antiszensz irányban juttatjuk be az SmaI-SstI-gyel hasított pHo4 kettős vektorba. Az antiszensz fragmentum transzkripcióját a patatin I promotorral indítjuk és az NOS terminátorral fejezzük be.

A pHoxwG antiszensz konstrukció előállításához a pJRDmitt HpaI-SstI fragmentumát antiszensz irányban visszük be az SmaI-SstI-gyel hasított pHo3 vektorba. Az antiszensz fragmentum transzkripcióját a saját GBSS promotorával indítjuk és a NOS terminátorral fejezzük be.

Antiszensz konstrukciók a III. fragmentummal (6. ábra)

A pHoxwK antiszensz konstrukció készítéséhez a pBlue3' BamHI-SstI fragmentumát antiszensz irányban visszük be a BamHI-SstI-gyel hasított pHo4 kettős vektorba. Az antiszensz fragmentum transzkripcióját a patatin I promotorral indítjuk és az NOS terminátorral fejezzük be.

A pHoxwL antiszensz fragmentumnál a pBlue3' BamHI-SstI fragmentumát antiszensz irányban a BamHI-SstI-gyel hasított pHo3 kettős vektorba juttatjuk. Az antiszensz fragmentum transzkripcióját ezután a saját GBSS promotorával indítjuk és a NOS terminátorral fejezzük be.

Az előállított antiszensz konstrukciókkal (4., 5. és 6. ábra) LBA4404 Agrobacterium tumefaciens törzsszel transzformálunk a „fagyasztás-olvasztásos” eljárás alkalmazásával (Hoekema és munkatársai, 1983; An és munkatársai, 1988).

Transzformálás

Az antiszensz konstrukciókat baktériumokba visszük, előnyösen a fagyasztás-olvasztásos eljárással (An és munkatársai, 1988). A rekombináns baktériumot burgonyaszövetre visszük oly módon, hogy a burgonyaszövetet a rekombináns baktériummal egy alkalmas közegben inkubáljuk, miután a burgonyaszöveten valamilyen módon sérülést hozunk létre. Az inkubálás alatt a baktériumból a T-DNS a gazdanövény DNS-ébe jut be. Az inkubálás után a baktériumokat elpusztítjuk és a burgonyaszövetet szilárd tápközegre visszük át kaluszképződés és növekedés céljából.

Miután további alkalmas tápközegre visszük át, hajtások képződnek, melyeket levágunk a burgonyaszövetről.

Az antiszensz konstrukciók expressziójának és a burgonya genomba való bejuttatásuknak ellenőrzésére például southern és northern hibridizációt (Maniatis és munkatársai /1982/) végzünk. A bejuttatott antiszensz konstrukciók kópiaszámát southern hibridizációval vizsgáljuk.

A fehérjeszinten való expresszió vizsgálatát előnyösen a transzformált hajtásokon in vitro indukált mikrogumókon végezzük lehetővé téve így, hogy a vizsgálatokat a lehető leggyorsabban hajtsuk végre.

A GBSS fehérje jellemzése

Az antiszensz konstrukciók hatását a GBSS gén működésére a GBSS fehérje aktivitását tekintve a keményítő mikrogumókból való kivonásával és ebben a GBSS fehérje jelenlétének analizálásával végezzük. Poliakrilamid gél elektroforézis (Hoverkamp-Hermelink és munkatársai, 1987) során ha a GBSS gén működik, a GBSS fehérje egy 60 kD molekulatömegű fehérjecsík formájában jelenik meg. Ha a GBSS gén nem expresszálódik, azaz az antiszensz GBSS gén teljes mértékben expresszálódik, így gátolja a GBSS gén képződését, a 60 kD-os fehérjecsík nem mutatható ki a gélen.

A keményítő jellemzése

A keményítő összetétele a mikrogumókban azonos a közönséges burgonyagumóéval, ezért az antiszensz konstrukciók amilóztermelésre gyakorolt hatását a mikrogumókban vizsgáljuk. Az amilóz: amilopektin arányt spektrofotometriás eljárással (például Hovenkamp-Hermelink és munkatársai, 1988 műben közöltek szerint) határozhatjuk meg.

Az amilopektin kivonása az amilopektin burgonyából

Az amilopektint az úgynevezett amilopektin-burgonyából (melyben az amilóztermelést a találmány szerinti antiszensz konstrukciók bejuttatásával gátoljuk) ismert módon vonjuk ki.

Az amilopektin leszármaztatása

Az amilopektin végső felhasználásától függően annak fizikai és kémiai tulajdonságait leszármaztatással módosítani lehet. A leszármaztatás itt kémiai, fizikai és enzimatisztikus kezelést vagy ezek kombinációját jelenti (módosított keményítők).

A kémiai leszármaztatást azaz az amilopektin kémiai módosítását különböző módokon végezhetjük például oxidáció, savas hidrolízis, dextrinizálás, különböző éteresítés, mint például kationizálás, hidroxipropilálás és hidroxietilálás, különböző észterezés, mint például vinil-acetáttal, acetanhidriddel vagy monofoszfátizálás, difoszfátizálás és oktenil-szukcinálás és ezek kombinációja útján.

Az amilopektin fizikai módosítását például szárítódobban való szárítással vagy kizárással végezhetjük.

Az amilopektin enzimatisztikus leszármaztatása, degradációja (a viszkozitás csökkentése) és kémiai módosítása végezhető a meglévő enzimrendszerek útján.

A leszármaztatást a kívánt végterméktől függően különböző hőmérsékleten végezzük. Az általánosan alkalmazott hőmérséklet-tartomány 20 és 45 °C közötti, de 180 °C-ig terjedő hőmérséklet is lehetséges.

A találmányt részletesebben a következő példákban ismertetjük.

1. példa

Mikrogumótermelés a találmány szerinti antiszensz konstrukciók bejuttatásával

Az antiszensz konstrukciókat (lásd 4., 5. és 6. ábra) LBA 4404 *Agrobacterium tumefaciens* törzsbe visszük a „fagyasztás-olvasztásos” eljárással (An és munkatársai, 1988). A burgonyaszövetre való átvitelt Rocha-Sosa és munkatársai, 1989, módosított eljárása szerint hajtjuk végre.

Az in vitro 3% szacharózt és 0,5% MES-t tartalmazó folyékony MS-tápközegen (Murashige és Skoog, 1962) sötétben tenyésztett burgonyanövény levéllemezeket 100 µl rekombináns *Agrobacterium* szuszpenzióval inkubáljuk 10 µl tápközegben 2 napig. Két nap után a baktériumokat elpusztítjuk. A levéllemezeket szilárd tápközegre visszük kalluszképződés céljából és a kallusznövekedéstől függően 4–6 hétig inkubáljuk. A szilárd tápközeg a következő összetételű:

MS+3% szacharóz
2 mg/l zeatin-ribozid
0,02 mg/l „NAA”
0,02 mg/l „GA₃”
500 mg/l „Claforan”
50 mg/l kanamicin
0,25% „Gellan”.

Ezt követően a levéllemezeket egy másik, eltérő hormontartalmú tápközegre visszük, melynek összetétele a következő:

MS+3% szacharóz
5 mg/l „NAA”
0,1 mg/l „BAP”
500 mg/l „Claforan”
50 mg/l kanamicin
0,25% „Gellan”.

A levéllemezeket ezen a tápközegen körülbelül 4 hétig tartjuk, majd egy olyan tápközegre visszük, melyben a „Claforan” koncentrációját 250 mg/l-re csökkentjük. Szükség szerint a levéllemezeket friss tápközegre visszük minden 4. vagy 5. héten. A hajtások képződése után ezeket levágjuk a levéllemezekről és azonos tápközegre visszük.

A levéllemezekre átvitt antiszensz konstrukciókat először a regenerált hajtásokból származó levél extraktumok glukuronidáz aktivitásának vizsgálatával végezzük a Jefferson és munkatársai 1987 által leírt szubsztrátokkal. Az aktivitást vizuális értékeléssel mutatjuk ki.

Az antiszensz konstrukciók expressziójának és a burgonya genomba való átvitelének további vizsgálatát southern és northern hibridizációval Maniatis és munkatársai, 1981, eljárása szerint. Az átvitt antiszensz konstrukciók kópiaszámát southern hibridizációval határozzuk meg.

Miután kimutatjuk, hogy az antiszensz konstrukciók átvitelre kerültek és kifejeződnek a burgonya genomjában, az expresszió fehérjeszinten való vizsgálatát kezdjük. A vizsgálatot azokon a mikrogumókon hajtjuk végre, melyeket a transzformált hajtásokon in vitro indukálunk, így nem szükséges a teljes burgonyanövény burgonyagumóinak kifejlődésére várnunk.

A burgonyahajtások kocsánydarabjait levágjuk a csomókról és egy módosított MS tápközegre helyezzük. Két–három hét sötétben 19 °C-on való inkubálás után ezek mikrogumókat alakítanak ki (Bourque és munkatársai, 1987). A tápközeg a következő összetételű:

MS+6% szacharóz
2,5 mg/l kinetin
2,5 mg/l „Gellan”.

Az antiszensz konstrukciók GBSS gén funkciójára gyakorolt hatását a GBSS fehérje aktivitását tekintve elektroforézissel vizsgáljuk poliakrilamid gélen (Hovenkamp-Hermelink és munkatársai, 1987). A mikrogumókból a keményítőt kivonjuk és a GBSS fehérje jelenlétére vizsgáljuk. Poliakrilamid gélen a GBSS fehérje egy 60 kD fehérjecsík formájában jelentkezik, ha a GBSS fehérje működik. Ha a GBSS gén nem expresszálódik, azaz amikor az antiszensz GBSS gén teljes mértékben expresszálódik, így a GBSS fehérje képződés gátolt, 60 kD fehérjecsík nem jelenik meg a gélen.

A keményítő összetételét, azaz az amilóz:amilopektin arányát spektrofotometriás eljárással határozzuk meg Hovenkamp-Hermelink és munkatársai, 1988, eljárása szerint, mindkét keményítő komponens mennyiségét egy standard görbe alapján mérjük.

2. példa

Az amilopektin kivonása amilopektin-burgonyából

A találmány szerinti génsebészeti úton módosított úgynevezett amilopektin-burgonyát, melynek fő keményítőkomponense amilopektin, leereszljük, ezáltal a keményítő kiszabadul a sejtfalból.

A sejtfalat (rostok) centrifugális szűrőn választjuk el a burgonyalétől és a keményítőtől. A burgonyalevet két lépésben választjuk el a burgonyakeményítőtől, először hidrociklonokban, majd speciálisan tervezett vákuumszűrőkön.

Ezután egy végső tisztítással eltávolítjuk a maradék burgonyalevet és rostokat hidrociklonokban.

A terméket két lépésben szárítjuk, először egy vákuumszűrőn való előszárítással, majd ezt követően véglegesen meleg levegőáramban.

3. példa

Az amilopektin kémiai leszármaztatása

Amilopektint vízben iszapolunk 20–50% közötti koncentrációban. A pH-t 10,0–12,0 közötti értékre állítjuk be, egy kvaterner ammóniumvegyületet adagolunk olyan mennyiségben, hogy a végtermékre 0,004–0,2 szubsztitúciós fokot kapjunk. A reakció-hőmérsékletet 20–45 °C-ra állítjuk. Amikor a reakció végbemegy, a pH-t 4–8 közötti értékre állítjuk és a terméket mossuk és szárítjuk. Ezzel a kezeléssel a keményítő 2-hidroxi-3-trimetil-ammónium-propil-éter kationos származékát kapjuk.

4. példa

Az amilopektin kémiai leszármaztatása

Amilopektint vízben iszapolunk 10–25 tömeg% víztartalom mellett. A pH-t 10,0–12,0 közötti értékre állít-

juk be és egy kvaterner ammóniumvegyületet adagolunk olyan mennyiségben, hogy a végtermék szubsztitúciós foka 0,004–0,2 legyen. A reakció-hőmérsékletet 20–45 °C-ra állítjuk. Amikor a reakció végbemegy, a pH-t 4–8 közötti értékre állítjuk. A végtermék 2-hidrox-3-trimetil-ammónium-propil éter.

5. példa

Az amilopektin kémiai származtatása

Amilopektint vízben iszapolunk 20–50 tömeg% koncentráció mellett. A pH-t 5–12,0 közötti értékre állítjuk és nátrium-hipokritot adagolunk úgy, hogy megfelelő viszkozitású végterméket kapjuk. A reakció-hőmérsékletet 20–45 °C-ra állítjuk. Amikor a reakció végbemegy, a pH-t 4–8 közötti értékre állítjuk, majd a végterméket mossuk és szárítjuk. Ezáltal oxidált keményítőt kapunk.

6. példa

Az amilopektin fizikai származtatása

Amilopektint vízben iszapolunk 20–50 tömeg% koncentráció mellett, majd az iszapot melegített hengerbe juttatjuk, ahol film formájában szárad meg.

7. példa

Az amilopektin kémiai és fizikai származtatása

Amilopektint a 3–5. példákban ismertetett folyamat valamelyike szerint kezeljük kémiai módosítás céljából, majd a 6. példa szerint kezeljük tovább fizikai származtatás céljából.

Referenciák:

- Mac Donald, F. D. and Preiss, J., 1985, *Plant. Physiol.* 78:849–8
- Preiss, J., 1988, In *The Biochemistry of Plants* 14 (Carbohydrates). Ed. J. Preiss, Academic Press; 181–254
- Echt, C. S. and Schwarz, D., 1981, *Genetics* 99:275–284
- Klösgen, R. B., Gierl, A., Schwarz-Sommer, Z. and Saedler, H., 1986, *Mol. Gen. Genet.* 203:237–244
- Schwarz-Sommer, Z., Gierl, A., Klösgen, R. B., Wienand, U., Peterson, P. A. and Saedler, H., 1984, *EMBO J.* 3(5):1021–1028
- Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N., 1983, *Cell* 35:225–233
- Jacobsen, E., Krigsheld, H. T., Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Ponstein, A. S., Witholt, H. and Feenstra, W. J., 1990, *Plant. Sci.* 67:177–182
- Visser, R. G. F., Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Ponstein, A. S., Vos-Scheperkeuter, G. H., Jacobson, E., Feenstra, W. J. and Witholt, H., 1987, *Proc. 4th European Congress on Biotechnology 1987*, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam; 432–435
- Vos-Scheperkeuter, G. H., De Boer, W., Visser, R. G. F., Feenstra, W. J. and Witholt, B., 1986, *Plant. Physiol.* 82:411–416
- Cornelissen, M., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17(18):7203–7209
- Izant, J. G., 1989, *Cell Motility and Cytoskeleton* 14:81–91

- Sheehy, R. E., Kramer, M., Hiatt, W. R., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(23):8805–8809
 - Van der Krol, A. R., Mur, L. A., de Lange, P., Gerats, A. G. M., Mol, J. N. M., and Stuitje, A. R., 1960, *Mol. Gen. Genet.* 220:204–212
 - Flavell, R. H., 1990, *AgBiotech. News and Information* 2(5):629–630
 - Hergersberger, M., 1988, *Molekulare Analyse des waxy Gens aus Solanum tuberosum und Expression von waxy antisense RNA in transgenen Kartoffeln*. Thesis for a doctorate; from the University in Cologne
 - Visser, R. G. F., Hergersberger, M., van der Leij, F. R., Jacobsen, E., Witholt, B. and Feenstra, W. J., 1989, *Plant. Sci.* 64:185–192
 - An, G., Ebert, P. R., Mitra, A. and Ha, S. B., 1987, *Plant Mol. Biol. Manual* A3:1–19
 - Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. and Schilperoort, R. A., 1983, *Nature* 303:179–180
 - Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and Bevan, M. W., 1987, *EMBO J.* 6:3201–3207
 - Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463–5467
 - Viera, J. and Messing, J., 1982, *Gene* 19:259–268
 - Yanisch-Perron, C., Viera, J. and Messing, J., 1985, *Gene* 33:103–119
 - Heusterspreute et al (1987) *Gene* 53:294–300
 - Melton, D. A. et al (1984), *Nucleic Acids Res.* 12:7035–7056 (the plasmide is sold by Stratagene)
 - Murashige, T. and Skoog, F., 1962, *Physiol. Plant* 15:473–497
 - Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Shell, J. and Willmitzer, L., 1989, *EMBO J.*, 8(1):23–29
 - Jefferson, R. A., Kavanagh, R. A. and Bevan, M. W., 1987, *EMBO J.* 6:3901–3907
 - Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J., 1982, *Molecular Cloning, A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
 - Bourque, J. E., Miller, J. C. and Park, W. D., 1987, In *Vitro Cellular & Development Biology* 23(5):381–386
 - Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., Jacobsen, E., Ponstein, A. S., Visser, R. G. F., Vos-Scheperkeuter, G. H., Bijmolt, E. W., de Vries, J. N., Witholt, B. J. Feenstra, W. J., 1987, *Theor. Appl. Genet.* 75:217–221
 - Hovenkamp-Hermelink, J. H. M., de Vries, J. N., Adamse, P., Jacobsen, E., Witholt, H. and Feenstra, W. J., 1988, *Potato Research* 31:241–246
 - Modified starches: Properties and use D. B. Wurzburg
 - Bevan, M. W., 1984. *Nucleic Acids Res.* 12:8711–8721.
- SZEKVENCIÁLISTA
1. szekvencia
- Szekvenált molekula: genom DNS
- Név: burgonyából származó GBSS génfragmentum
- 60 Szekvenciahosszúság: 342 bp

TGCATGTTTC CCTACATTCT ATTTAGAATC GTGTTGTGGT GTATAAACGT 50
 TGTTTCATAT CTCATCTCAT CTATTCTGAT TTTGATTCTC TTGCCTACTG 100
 TAATCGGTGA TAAATGTGAA TGCTTCCTTT CTTCTCAGAA ATCAATTTCT 150
 GTTTTGTGTTT TGTTTCATCTG TAGCTTATTC TCTGGTAGAT TCCCCTTTTTT 200
 GTAGACCACA CATCAC ATG GCA AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC 243
 Met Ala Ser Ile Thr Ala Ser His His

1

5

TTT GTG TCA AGA AGC CAA ACT TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC 285
 Phe Val Ser Arg Ser Gln Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr
 10 15 20

TTG TCA CAG ATA GGA CTC AGG AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT 327
 Leu Ser Gln Ile Gly Leu Arg Asn His Thr Leu Thr His Asn
 25 30 35

GGT TTA AGG GCT GTT 342
 Gly Leu Arg Ala Val
 40

2. szekvencia
 Szekvenált molekula: genom DNS

Név: burgonyából származó GBSS génfragmentum
 Szekvenciahosszúság: 2549 bp

AAC AAG CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA 42
 Asn Lys Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val
 45 50 55

ACA CCC AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA 84
 Thr Pro Lys Met Ala Ser Arg Thr Glu Thr Lys Arg Pro Gly
 60 65 70

TGC TCA GCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC 126
 Cys Ser Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile
 75 80

TTT GTG GGT ACT GAG GTT GGT CCT TGG AGC AAA ACT GGT GGA 168
 Phe Val Gly Thr Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly
 85 90 95

CTA GGT GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA 207
 Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala
 100 105 110

GTAAGTCTTT CTTTCATTTG GTTACCTACT CATTCATTAC TTATTTTGTGTT 257
 TAGTTAGTTT CTACTGCATC AGTCTTTTTC TCATTTAG GCC CGC GGA 304
 Ala Arg Gly

CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA 346
 His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys
 115 120 125

GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG GTACATCTTC 386
 Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu
 130 135

CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTTTCCT GATTCAAGAA 436
 TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT 481
 Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val
 140 145

CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT 523
 Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe
 150 155 160

GTT GAC CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA GTAAGCATAT 560
 Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys
 165 170

TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATACG CAGAACAGGT CATTTTGAGT 610
 ATCTTTTAAC TCTACTGGTG CTTTACTCT TTTAAG GTT TGG GGC AAA 658
 Val Trp Gly Lys
 175

ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT 700
 Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr
 180 185

CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA 736
 Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln
 190 195 200

GTAAGTTAGT TACTCTTGAT TTTTATGTGG CATTTTACTC TTTTGTCTTT 786
 AATCGTTTTT TTAACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT 832
 Ala Ala Leu Glu Ala Pro
 205

AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA 874
 Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro
 210 215 220

TAT G GTAATTAACA CATCCTAGTT TCAGAAACT CCTTACTATA 918
 Tyr G

TCATTGTAGG TAATCATCTT TATTTTGCCT ATTCCTGCAG GA GAG GAT 966
 ly Glu Asp
 225

GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GCT CTC ATT CCT 1008
 Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Ile Pro
 230 235

TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG 1050
 Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu
 240 245 250

AAT GCC AAG GTAAAATTC TTTGTATTCA CTCGATTGCA 1089
 Asn Ala Lys
 255

CGTTACCCTG CAAATCAGTA AGGTTGTATT AATATATGAT AAATTTTACA 1139
 TTGCCTCCAG GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA 1182
 Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln
 260 265

GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT 1224
 Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro
 270 275 280

GAT GAA TTC AGG GGT TCT TTT GAT TTC ATT GAT GGG TAT	1263
Asp Glu Phe Arg Gly Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr	
285 290	
GTATTTATGC TTGAAATCAG ACCTCCAACT TTTGAAGCTC TTTTGATGCT	1313
AGTAAATTGA GTTTTTAAAA TTTTGCAGAT ATGAG AAG CCT GTT AAG	1360
Lys Pro Val Lys	
295	
GGT AGG AAA ATC AAC TGG ATG AAG GCT GGG ATA TTA GAA TCA	1402
Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ser	
300 305 310	
CAT AGG GTG GTT ACA GTG AGC CCA TAC TAT GCC CAA GAA CTT	1444
His Arg Val Val Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Gln Glu Leu	
315 320 325	
GTC TCT GCT GTT GAC AAG GGA GTT GAA TTG GAC AGT GTC CTT	1486
Val Ser Ala Val Asp Lys Gly Val Glu Leu Asp Ser Val Leu	
330 335 340	
CGT AAG ACT TGC ATA ACT GGG ATT GTG AAT GGC ATG GAT ACA	1528
Arg Lys Thr Cys Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Thr	
345 350	
CAA GAG TGG AAC CCA GCG ACT GAC AAA TAC ACA GAT GTC AAA	1570
Gln Glu Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Tyr Thr Asp Val Lys	
355 360 365	
TAC GAT ATA ACC ACT GTAAGATAAG ATTTTTC CGA CTCCAGTATA	1615
Tyr Asp Ile Thr Thr	
370	
TACTAAATTA TTTTGTATGT TTATGAAATT AAAGAGTTCT TGCTAATCAA	1665
AATCTCTATA CAG GTC ATG GAC GCA AAA CCT TTA CTA AAG GAG	1708
Val Met Asp Ala Lys Pro Leu Leu Lys Glu	
375 380	
GCT CTT CAA GCA GCA GTT GGC TTG CCT GTT GAC AAG AAG ATC	1756
Ala Leu Gln Ala Ala Val Gly Leu Pro Val Asp Lys Lys Ile	
385 390 395	
CCT TTG ATT GGC TTC ATC GGC AGA CTT GAG GAG CAG AAA GGT	1792
Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly	
400 405 410	
TCA GAT ATT CTT GTT GCT GCA ATT CAC AAG TTC ATC GGA TTG	1834
Ser Asp Ile Leu Ala Val Ala Ile His Lys Phe Ile Gly Leu	
415 420 425	
GAT GTT CAA ATT GTA GTC CTT GTAAGTACCA AATGGACTCA	1875
Asp Val Gln Ile Val Val Leu	
430	

TGGTATCTCT CTTGTTGAGT TTACTTGTGC CGAAACTGAA ATTGACCTGC 1925
 TACTCATCCT ATGCATCAG GGA ACT GGC AAA AAG GAG TTT GAG 1968
 Gly Thr Gly Lys Lys Glu Phe Glu
 435 440

CAG GAG ATT GAA CAG CTC GAA GTG TTG TAC CCT AAC AAA GCT 2010
 Gln Glu Ile Glu Gln Leu Glu Val Leu Tyr Pro Asn Lys Ala
 445 450

AAA GGA GTG GCA AAA TTC AAT GTC CCT TTG GCT CAC ATG ATC 2052
 Lys Gly Val Ala Lys Phe Asn Val Pro Leu Ala His Met Ile
 455 460 465

ACT GCT GGT GCT GAT TTT ATG TTG GTT CCA AGC AGA TTT GAA 2094
 Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu
 470 475 480

CCT TGT GGT CTC ATT CAG TTA CAT GCT ATG CGA TAT GGA ACA 2136
 Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr Gly Thr
 485 490 495

GTAAGAACCA GAAGAGCTTG TACCTTTTTTA CTGAGTTTTT AAAAAAGAA 2186
 TCATAAGACC TTGTTTCCA TCTAAAGTTT AATAACCAAC TAAATGTTAC 2236
 TGCAGCAAGC TTTTCATTTC TGAAAATTGG TTATCTGATT TTAACGTAAT 2286
 CACATGTGAG TCAG GTA CCA ATC TGT GCA TCG ACT GGT GGA CTT 2330
 Val Pro Ile Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu
 500 505

GTT GAC ACT GTG AAA GAA GGC TAT ACT GGA TTC CAT ATG GGA 2372
 Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe His Met Gly
 510 515 520

GCC TTC AAT GTT GAA GTATGTGATT TTACATCAAT TGTGTACTTG 2417
 Ala Phe Asn Val Glu
 525

TACATGGTCC ATTCTCGTCT TGATATACCC CTTGTTGCAT AAACATTAAC 2467
 TTATTGCTTC TTGAATTTGG TTAG TGC GAT GTT GTT GAC CCA GCT 2512
 Cys Asp Val Val Asp Pro Ala
 530

GAT GTG CTT AAG ATA GTA ACA ACA GTT GCT AGA GCT C 2549
 Asp Val Leu Lys Ile Val Thr Thr Val Ala Arg Ala
 535 540

3. szekvencia
 Szekvenált molekula: genom DNS

Név: burgonyából származó GBSS génfragmentum
 50 Szekvenciahosszúság: 492 bp

GAG CTC TCC TGG AAG GTAAGTGTGA ATTTGATAAT TTGCGTAGGT 45
 Glu Leu Ser Trp Lys
 565

ACTTCAGTTT GTTGTTCTCG TCAGCACTGA TGGATTCCAA CTGGTGTCT 95
 TGCAG GAA CCT GCC AAG AAA TGG GAG ACA TTG 127
 Glu Pro Ala Lys Lys Trp Glu Thr Leu
 570 575

CTA TTG GGC TTA GGA GCT TCT GGC AGT GAA CCC GGT GTT GAA	169
Leu Leu Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gly Val Glu	
580 585 590	
GGG GAA GAA ATC GCT CCA CTT GCC AAG GAA AAT GTA GCC ACT	211
Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Thr	
595 600 605	
CCT TAA ATGAGCTTTG GTTATCCTTG TTTCAACAAT AAGATCATT	257
Pro ***	
606	
AGCAAACGTA TTTACTAGCG AACTATGTAG AACCTATTA TGGGGTCTCA	307
ATCATCTACA AAATGATTGG TTTTGTCTGG GGAGCAGCAG CATATAAGGC	357
TGTAATCC TGGTTAATGT TTTGTAGGT AAGGGCTATT TAAGGTGGTG	407
TGGATCAAAG TCAATAGAAA ATAGTTATTA CTAACGTTTG CAACTAAATA	457
CTTAGTAATG TAGCATAAAT AATACTAGAA CTAGT	492

4. szekvencia

Szekvenált molekula: genom DNS

Név: burgonyából származó GBSS gén promotere

20 Szekvenciahosszúság: 987 bp

AAGCTTTAAC GAGATAGAAA ATTATGTTAC TCCGTTTGT TCATTACTTA	50
ACAAATGCAA CAGTATCTTG TACCAAATCC TTTCTCTCTT TTCAAACCTT	100
TCTATTTGGC TGTTGACGGA GTAATCAGGA TACAAACCAC AAGTATTTAA	150
TTGACTCCTC CGCCAGATAT TATGATTTAT GAATCCTCGA AAAGCCTATC	200
CATTAAGTCC TCATCTATGG ATATACTTGA CAGTATCTTC CTGTTTGGGT	250
ATTTTTTTTT CCTGCCAAGT GGAACGGAGA CATGTTATGA TGTATACGGG	300
AAGCTCGTTA AAAAAAATA CAATAGGAAG AAATGTAACA AACATTGAAT	350
GTTGTTTTTA ACCATCCTTC CTTAGCAGT GTATCAATTT TGTAATAGAA	400
CCATGCATCT CAATCTTAAT ACTAAAATGC AACTTAATAT AGGCTAAACC	450
AAGATAAAGT AATGTATTCA ACCTTTAGAA TTGTGCATTC ATAATTAGAT	500
CTTGTTTGTC GTAAAAAATT AGAAAATATA TTTACAGTAA TTTGGAATAC	550
AAAGCTAAGG GGAAGTAAC TAATATTCTA GTGGAGGGAG GGACCAGTAC	600
CAGTACCTAG ATATTATTTT TAATTACTAT AATAATAATT TAATTAACAC	650
GAGACATAGG AATGTCAAGT GGTAGCGTAG GAGGGAGTTG GTTTAGTTTT	700
TTAGATACTA GGAGACAGAA CCGGACGGCC CATTGCAAGG CCAAGTTGAA	750
GTCCAGCCGT GAATCAACAA AGAGAGGGCC CATAATACTG TCGATGAGCA	800
TTTCCCTATA ATACAGTGTC CACAGTTGCC TTCTGCTAAG GGATAGCCAC	850
CCGCTATTCT CTTGACACGT GTCAGTAAA CCTGCTACAA ATAAGGCAGG	900
CACCTCCTCA TTCTCACTCA CTCACTACA CAGCTCAACA AGTGGTAACT	950
TTTACTCATC TCCTCCAATT ATTTCTGATT TCATGCA	987

5. szekvencia

Szekvenált molekula: genom DNS

Név: burgonyából származó GBSS gén

55 Szekvenciahosszúság: 4964 bp

AAGCTTTAAC GAGATAGAAA ATTATGTTAC TCCGTTTGT TCATTACTTA	50
ACAAATGCAA CAGTATCTTG TACCAAATCC TTTCTCTCTT TTCAAACCTT	100
TCTATTTGGC TGTTGACGGA GTAATCAGGA TACAAACCAC AAGTATTTAA	150

TTGACTCCTC CGCCAGATAT TATGATTTAT GAATCCTCGA AAAGCCTATC	200
CATTAAGTCC TCATCTATGG ATATACTTGA CAGTATCTTC CTGTTTGGGT	250
ATTTTTTTTT CCTGCCAAGT GGAACGGAGA CATGTTATGA TGTATACGGG	300
AAGCTCGTTA AAAAAAATA CAATAGGAAG AAATGTAACA AACATTGAAT	350
GTTGTTTTTA ACCATCCTTC CTTTAGCAGT GTATCAATTT TGTAAATAGAA	400
CCATGCATCT CAATCTTAAT ACTAAAATGC AACTTAATAT AGGCTAAACC	450
AAGATAAAGT AATGTATTCA ACCTTTAGAA TTGTGCATTC ATAATTAGAT	500
CTTGTTTGTC GTAAAAAATT AGAAAATATA TTTACAGTAA TTTGGAATAC	550
AAAGCTAAGG GGAAGTAAC TAATATTCTA GTGGAGGGAG GGACCAGTAC	600
CAGTACCTAG ATATTATTTT TAATTACTAT AATAATAATT TAATTAACAC	650
GAGACATAGG AATGTCAAGT GGTAGCGTAG GAGGGAGTTG GTTTAGTTTT	700
TTAGATACTA GGAGACAGAA CCGGACGGCC CATTGCAAGG CCAAGTTGAA	750
GTCCAGCCGT GAATCAACAA AGAGAGGGCC CATAATACTG TCGATGAGCA	800
TTTCCCTATA ATACAGTGTC CACAGTTGCC TTCTGCTAAG GGATAGCCAC	850
CCGCTATTCT CTTGACACGT GTCAC TGAAA CCTGCTACAA ATAAGGCAGG	900
CACCTCCTCA TTCTCACTCA CTCAC TCACA CAGCTCAACA AGTGGTAACT	950
TTTACTCATC TCCTCCAATT ATTTCTGATT TCATGCATGT TTCCCTACAT	1000
TCTATTATGA ATCGTGTTGT GGTGTATAAA CGTTGTTTCA TATCTCATCT	1050
CATCTATTCT GATTTTGATT CTCTTGCCCTA CTGTAATCGG TGATAAATGT	1100
GAATGCTTCC TTTCTTCTCA GAAATCAATT TCTGTTTTGT TTTTGTTTCAT	1150
CTGTAGCTTA TTCTCTGGTA GATTCCCCTT TTTGTAGACC ACACATCAC	1199
ATG GCA AGC ATC ACA GCT TCA CAC CAC TTT GTG TCA AGA AGC	1241
Met Ala Ser Ile Thr Ala Ser His His Phe Val Ser Arg Ser	
1 5 10	
CAA ACT TCA CTA GAC ACC AAA TCA ACC TTG TCA CAG ATA GGA	1283
Gln Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Thr Leu Ser Gln Ile Gly	
15 20 25	
CTC AGG AAC CAT ACT CTG ACT CAC AAT GGT TTA AGG GCT GTT	1325
Leu Arg Asn His Thr Leu Thr His Asn Gly Leu Arg Ala Val	
30 35 40	
AAC AAG CTT GAT GGG CTC CAA TCA ACA ACT AAT ACT AAG GTA	1367
Asn Lys Leu Asp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Asn Thr Lys Val	
45 50 55	
ACA CCC AAG ATG GCA TCC AGA ACT GAG ACC AAG AGA CCT GGA	1409
Thr Pro Lys Met Ala Ser Arg Thr Glu Thr Lys Arg Pro Gly	
60 65 70	
TGC TCA GCT ACC ATT GTT TGT GGA AAG GGA ATG AAC TTG ATC	1451
Cys Ser Ala Thr Ile Val Cys Gly Lys Gly Met Asn Leu Ile	
75 80	
TTT GTG GGT ACT GAG GTT GGT CCT TGG AGC AAA ACT GGT GGA	1493
Phe Val Gly Thr Glu Val Gly Pro Trp Ser Lys Thr Gly Gly	
85 90 95	

CTA GGT GAT GTT CTT GGT GGA CTA CCA CCA GCC CTT GCA	1532
Leu Gly Asp Val Leu Gly Gly Leu Pro Pro Ala Leu Ala	
100 105 110	
GTAAGTCTTT CTTTCATTTG GTTACCTACT CATTTCATTAC TTATTTTGTT	1582
TAGTTAGTTT CTACTGCATC AGTCTTTTTTA TCATTTAG GCC CGC GGA	1629
Ala Arg Gly	
CAT CGG GTA ATG ACA ATA TCC CCC CGT TAT GAC CAA TAC AAA	1671
His Arg Val Met Thr Ile Ser Pro Arg Tyr Asp Gln Tyr Lys	
115 120 125	
GAT GCT TGG GAT ACT GGC GTT GCG GTT GAG GTACATCTTC	1711
Asp Ala Trp Asp Thr Gly Val Ala Val Glu	
130 135	
CTATATTGAT ACGGTACAAT ATTGTTCTCT TACATTTTCCT GATTCAAGAA	1761
TGTGATCATC TGCAG GTC AAA GTT GGA GAC AGC ATT GAA ATT GTT	1806
Val Lys Val Gly Asp Ser Ile Glu Ile Val	
140 145	
CGT TTC TTT CAC TGC TAT AAA CGT GGG GTT GAT CGT GTT TTT	1848
Arg Phe Phe His Cys Tyr Lys Arg Gly Val Asp Arg Val Phe	
150 155 160	
GTT GAC CAC CCA ATG TTC TTG GAG AAA GTAAGCATAT	1885
Val Asp His Pro Met Phe Leu Glu Lys	
165 170	
TATGATTATG AATCCGTCCT GAGGGATACG CAGAACAGGT CATTTTGAGT	1935
ATCTTTTAAC TCTACTGGTG CTTTACTCT TTTAAG GTT TGG GGC AAA	1983
Val Trp Gly Lys	
175	
ACT GGT TCA AAA ATC TAT GGC CCC AAA GCT GGA CTA GAT TAT	2025
Thr Gly Ser Lys Ile Tyr Gly Pro Lys Ala Gly Leu Asp Tyr	
180 185	
CTG GAC AAT GAA CTT AGG TTC AGC TTG TTG TGT CAA	2061
Leu Asp Asn Glu Leu Arg Phe Ser Leu Leu Cys Gln	
190 195 200	
GTAAGTTAGT TACTCTTGAT TTTTATGTGG CATTTTACTC TTTTGTCTTT	2111
AATCGTTTTT TTAACCTTGT TTTCTCAG GCA GCC CTA GAG GCA CCT	2157
Ala Ala Leu Glu Ala Pro	
205	
AAA GTT TTG AAT TTG AAC AGT AGC AAC TAC TTC TCA GGA CCA	2199
Lys Val Leu Asn Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Phe Ser Gly Pro	
210 215 220	
TAT G GTAATTAACA CATCCTAGTT TCAGAAACT CCTTACTATA	2243
Tyr G	
TCATTGTAGG TAATCATCTT TATTTTGCCT ATTCCTGCAG GA GAG GAT	2291
ly Glu Asp	
225	

GTT CTC TTC ATT GCC AAT GAT TGG CAC ACA GCT CTC ATT CCT 2333
Val Leu Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Ile Pro
230 235

TGC TAC TTG AAG TCA ATG TAC CAG TCC AGA GGA ATC TAC TTG 2375
Cys Tyr Leu Lys Ser Met Tyr Gln Ser Arg Gly Ile Tyr Leu
240 245 250

AAT GCC AAG GTAAAATTC TTTGTATTCA CTCGATTGCA 2414
Asn Ala Lys
255

CGTTACCCTG	CAAATCAGTA	AGGTTGTATT	AATATATGAT	AAATTTCACA	2464
TTGCTCCAG	GTT GCT TTC TGC ATC CAT AAC ATT GCC TAC CAA				2507
	Val Ala Phe Cys Ile His Asn Ile Ala Tyr Gln				
	260			265	

GGT CGA TTT TCT TTC TCT GAC TTC CCT CTT CTC AAT CTT CCT 2549
Gly Arg Phe Ser Phe Ser Asp Phe Pro Leu Leu Asn Leu Pro
270 275 280

GAT GAA TTC AGG GGT TCT TTT GAT TTC ATT GAT GGG TAT 2588
Asp Glu Phe Arg Gly Ser Phe Asp Phe Ile Asp Gly Tyr
285 290

```

GTATTTATGC TTGAAATCAG ACCTCCAAC TTTGAAGCTC TTTTGATGCT 2638
AGTAAATTGA GTTTTTAAAA TTTTGCAGAT ATGAG AAG CCT GTT AAG 2685
                               Lys Pro Val Lys
                               295

```

GGT AGG AAA ATC AAC TGG ATG AAG GCT GGG ATA TTA GAA TCA 2727
Gly Arg Lys Ile Asn Trp Met Lys Ala Gly Ile Leu Glu Ser
300 305 310

CAT AGG GTG GTT ACA GTG AGC CCA TAC TAT GCC CAA GAA CTT 2769
His Arg Val Val Thr Val Ser Pro Tyr Tyr Ala Gln Glu Leu
315 320 325

GTC TCT GCT GTT GAC AAG GGA GTT GAA TTG GAC AGT GTC CTT 2811
Val Ser Ala Val Asp Lys Gly Val Glu Leu Asp Ser Val Leu
330 335 340

CGT AAG ACT TGC ATA ACT GGG ATT GTG AAT GGC ATG GAT ACA 2853
Arg Lys Thr Cys Ile Thr Gly Ile Val Asn Gly Met Asp Thr
345 350

CAA GAG TGG AAC CCA GCG ACT GAC AAA TAC ACA GAT GTC AAA 2895
Gln Glu Trp Asn Pro Ala Thr Asp Lys Tyr Thr Asp Val Lys
355 360 365

TAC GAT ATA ACC ACT GTAAGATAAG ATTTTTC CGA CTCCAGTATA 2940
Tyr Asp Ile Thr Thr
370

TACTAAATTA TTTTGTATGT TTATGAAATT AAAGAGTTCT TGCTAATCAA 2990
 AATCTCTATA CAG GTC ATG GAC GCA AAA CCT TTA CTA AAG GAG 3033
 Val Met Asp Ala Lys Pro Leu Leu Lys Glu
 375 380

GCT CTT CAA GCA GCA GTT GGC TTG CCT GTT GAC AAG AAG ATC 3075
 Ala Leu Gln Ala Ala Val Gly Leu Pro Val Asp Lys Lys Ile
 385 395

CCT TTG ATT GGC TTC ATC GGC AGA CTT GAG GAG CAG AAA GGT 3117
 Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Glu Glu Gln Lys Gly
 400 410

TCA GAT ATT CTT GTT GCT GCA ATT CAC AAG TTC ATC GGA TTG 3159
 Ser Asp Ile Leu Ala Val Ala Ile His Lys Phe Ile Gly Leu
 415 425

GAT GTT CAA ATT GTA GTC CTT GTAAGTACCA AATGGACTCA 3200
 Asp Val Gln Ile Val Val Leu
 430

TGGTATCTCT CTTGTTGAGT TTAAGTGTGC CGAAACTGAA ATTGACCTGC 3250
 TACTCATCCT ATGCATCAG GGA ACT GGC AAA AAG GAG TTT GAG 3293
 Gly Thr Gly Lys Lys Glu Phe Glu
 435 440

CAG GAG ATT GAA CAG CTC GAA GTG TTG TAC CCT AAC AAA GCT 3335
 Gln Glu Ile Glu Gln Leu Glu Val Leu Tyr Pro Asn Lys Ala
 445 450

AAA GGA GTG GCA AAA TTC AAT GTC CCT TTG GCT CAC ATG ATC 3377
 Lys Gly Val Ala Lys Phe Asn Val Pro Leu Ala His Met Ile
 455 465

ACT GCT GGT GCT GAT TTT ATG TTG GTT CCA AGC AGA TTT GAA 3419
 Thr Ala Gly Ala Asp Phe Met Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu
 470 480

CCT TGT GGT CTC ATT CAG TTA CAT GCT ATG CGA TAT GGA ACA 3461
 Pro Cys Gly Leu Ile Gln Leu His Ala Met Arg Tyr Gly Thr
 485 495

GTAAGAACCA GAAGAGCTTG TACCTTTTTTA CTGAGTTTTT AAAAAAAGAA 3511
 TCATAAGACC TTGTTTTCCA TCTAAAGTTT AATAACCAAC TAAATGTTAC 3561
 TGCAGCAAGC TTTTCATTC TGAAAATTGG TTATCTGATT TTAACGTAAT 3611
 CACATGTGAG TCAG GTA CCA ATC TGT GCA TCG ACT GGT GGA CTT 3655
 Val Pro Ile Cys Ala Ser Thr Gly Gly Leu
 500 505

GTT GAC ACT GTG AAA GAA GGC TAT ACT GGA TTC CAT ATG GGA 3697
 Val Asp Thr Val Lys Glu Gly Tyr Thr Gly Phe His Met Gly
 510 520

GCC TTC AAT GTT GAA GTATGTGATT TTACATCAAT TGTGTACTTG 3742
 Ala Phe Asn Val Glu
 525

TACATGGTCC ATTCTCGTCT TGATATACCC CTTGTTGCAT AAACATTAAC 3792
 TTATTGCTTC TTGAATTGG TTAG TGC GAT GTT GTT GAC CCA GCT 3837
 Cys Asp Val Val Asp Pro Ala
 530

GAT GTG CTT AAG ATA GTA ACA ACA GTT GCT AGA GCT CTT GCA 3879
 Asp Val Leu Lys Ile Val Thr Thr Val Ala Arg Ala Leu Ala
 535 540 545

GTC TAT GGC ACC CTC GCG TTT GCT GAG ATG ATA AAA AAT TGC 3921
 Val Tyr Gly Thr Leu Ala Phe Ala Glu Met Ile Lys Asn Cys
 550 555 560

ATG TCA GAG GAG CTC TCC TGG AAG GTAAGTGTGA ATTTGATAAT 3965
 Met Ser Glu Glu Leu Ser Trp Lys
 565

TTGCGTAGGT ACTTCAGTTT GTTGTTCCTCG TCAGCACTGA TGGATTCCAA 4015
 CTGGTGTCT TGCAG GAA CCT GCC AAG AAA TGG GAG ACA TTG 4057
 Glu Pro Ala Lys Lys Trp Glu Thr Leu
 570 575

CTA TTG GGC TTA GGA GCT TCT GGC AGT GAA CCC GGT GTT GAA 4099
 Leu Leu Gly Leu Gly Ala Ser Gly Ser Glu Pro Gly Val Glu
 580 585 590

GGG GAA GAA ATC GCT CCA CTT GCC AAG GAA AAT GTA GCC ACT 4141
 Gly Glu Glu Ile Ala Pro Leu Ala Lys Glu Asn Val Ala Thr
 595 600 605

CCT TAA ATGAGCTTTG GTTATCCTTG TTTCAACAAT AAGATCATT A 4187
 Pro ***
 606

AGCAAACGTA TTTACTAGCG AACTATGTAG AACCCATTATTA TGGGGTCTCA 4237
 ATCATCTACA AAATGATTGG TTTTGTCTGG GGAGCAGCAG CATATAAGGC 4287
 TGTAATAATCC TGGTTAATGT TTTTGTAGGT AAGGGCTATT TAAGGTGGTG 4337
 TGGATCAAAG TCAATAGAAA ATAGTTATTA CTAACGTTTG CAACTAAATA 4387
 CTTAGTAATG TAGCATAAAT AATACTAGAA CTAGTAGCTA ATATATATGC 4437
 GTGAATTGT TGTACCTTTT CTTGCATAAT TATTGTCAGT ACATATATAA 4487
 TGAAAATTAC CCAAGGAATC AATGTTTCTT GCTCCGTCCT CCTTGTATGA 4537
 TTTTTCACGC AATACAGAGC TAGTGTGTTA TGTTATAAAT TTTGTTTAAA 4587
 AGAAGTAATC AAATTCAAAT TAGTTGTTTG GTCATATGAA AGAAGCTGCC 4637
 AGGCTAACTT TGAGGAGATG GCTATTGAAT TTCAAATGA TTATGTGAAA 4687
 ACAATGCAAC ATCTATGTCA ATCAACACTT AAATTATTGC ATTTAGAAAG 4737
 ATATTTTGA GCCCATGACA CATTCAATCA TAAAGTAAGG TAGTATGTAT 4787
 GATTGAATGG ACTACAGCTC AATCAAAGCA TCTCCTTTAC ATAACGGCAC 4837
 TGTCTCTTGT CTACTACTCT ATTGGTAGTA GTAGTAGTAA TTTTACAATC 4887
 CAAATTGAAT AGTAATAAGA TGCTCTCTAT TTAATAAGT AGTAGTATTA 4937
 TTCTTTCGTT ACTCTAAAGC AACAAAA 4964

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a burgonyában való amilózképződés gátlására, *azzal jellemezve*, hogy a burgonyát génszabványi úton úgy módosítjuk, hogy a burgonyaszövet genom-

jába egy olyan fragmentumot tartalmazó génkonstrukciót juttatunk be antiszensz irányban, mely a szemcsékötött keményítőszintetáz képződéséért felelős gént kódolja (GBSS gén), ahol a fenti fragmentum az 1., 2. vagy 3. azonosító számú nukleotidszekvenciával azonos vagy

azok bármelyikének komplementerével sztringens körülmények között hibridizálódni képes szekvenciát és CaMV 35S, patatin I vagy GBSS promotert tartalmaz.

2. Eljárás amilopektin típusú természetes keményítő előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 14. igénypont szerinti burgonyagumóból állítjuk elő.

3. Eljárás amilopektin típusú keményítőszármazék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 14. igénypont szerinti burgonyagumóból előállított keményítőt állítunk elő, majd önmagában ismert kémiai, fizikai vagy enzimatisz eljárással módosítjuk.

4. A burgonya szemcsekötött keményítőszintetáz (GBSS) enzimét kódoló gén fragmentuma, *azzal jellemezve*, hogy a fragmentum lényegében az 1., 2. vagy 3. azonosító számú nukleotidszekvenciát tartalmazza.

5. A burgonya szemcsekötött keményítőszintetáz (GBSS) enzimét kódoló gén promotere, *azzal jellemezve*, hogy a promoter gumóspecifikus és lényegében a 4. azonosító számú nukleotidszekvenciát tartalmazza.

6. A burgonya szemcsekötött keményítőszintetáz (GBSS) enzimét kódoló gén fragmentuma, *azzal jellemezve*, hogy lényegében az 5. azonosító számú nukleotidszekvenciát tartalmazza.

7. Antiszensz konstrukció a burgonya szemcsekötött keményítőszintetáz gén expressziójának gátlására, *azzal jellemezve*, hogy tartalmaz a) egy promotert és b) antiszensz irányban szemcsekötött keményítőszintetáz génből származó, lényegében az 1., 2. vagy 3. azonosító számú nukleotidszekvenciával azonos szekvenciájú fragmentumot, vagy egy, annak komplementerével sztringens körülmények között hibridizálni képes szekvenciát.

8. A 7. igénypont szerinti antiszensz konstrukció, *azzal jellemezve*, hogy a promoterszekvenciája lényegében a 4. azonosító számú nukleotidszekvenciát tartalmazza.

9. A 7. igénypont szerinti antiszensz konstrukció, *azzal jellemezve*, hogy a promoter a CaMV 35S promoter és a patatin I promoter bármelyike.

10. A burgonya szemcsekötött keményítőszintetáz (GBSS) kódoló gén egyik fragmentumát hordozó vektor, *azzal jellemezve*, hogy a fragmentum lényegében az 1., 2. vagy 3. azonosító számú nukleotidszekvenciák vagy funkcionális származékai közül egyet vagy többet tartalmaz, és antiszensz irányban helyezkedik el.

11. A 10. igénypont szerinti vektor, *azzal jellemezve*, hogy a 7–9. igénypontok szerinti antiszensz konstrukciók bármelyikét tartalmazza.

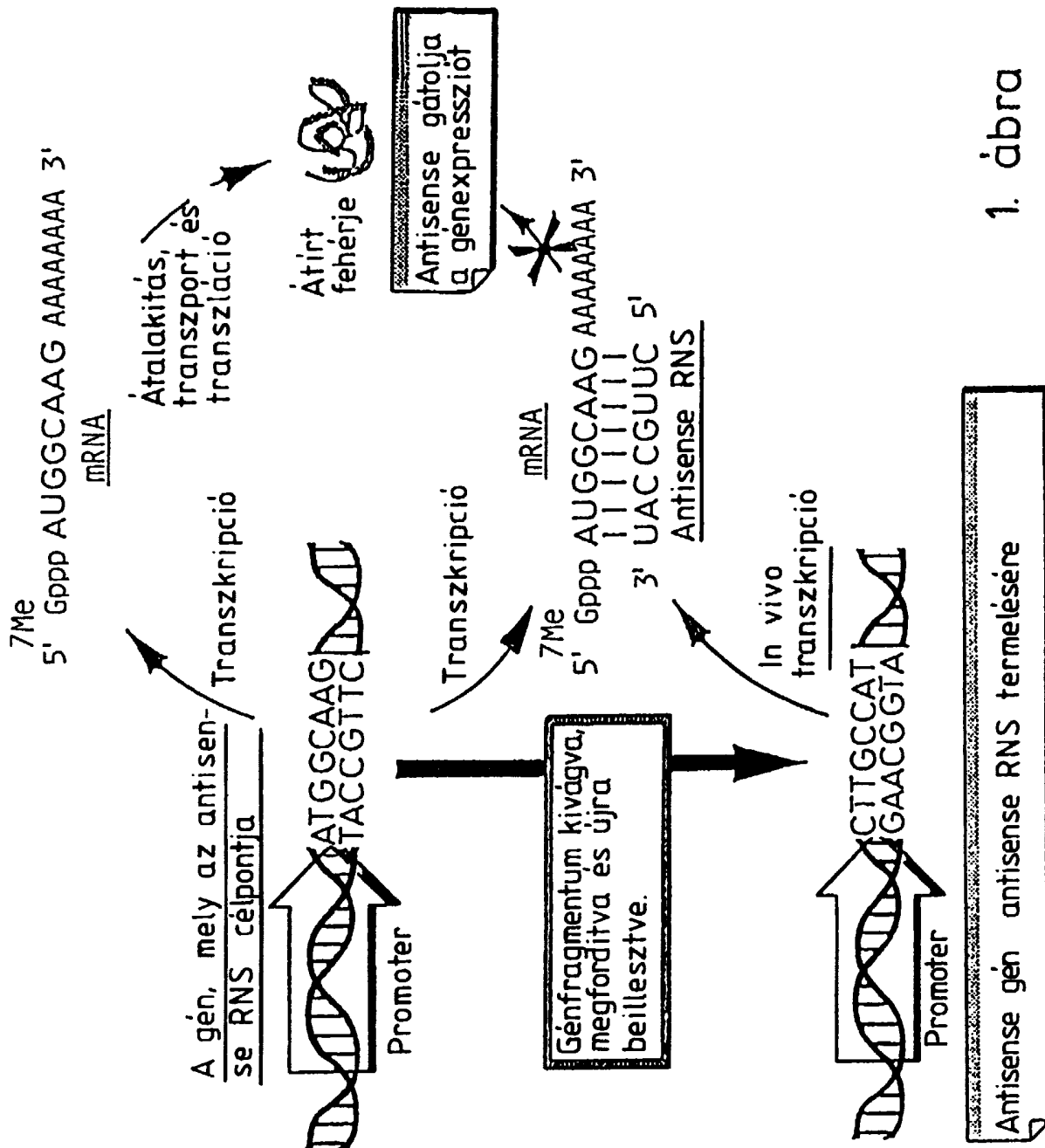
12. Burgonyanövény sejtje, *azzal jellemezve*, hogy a genomja a 7–9. igénypontok szerinti antiszensz konstrukciók bármelyikét tartalmazza.

13. Burgonyanövény, *azzal jellemezve*, hogy a genomja a 7–9. igénypontok szerinti antiszensz konstrukciók bármelyikét tartalmazza.

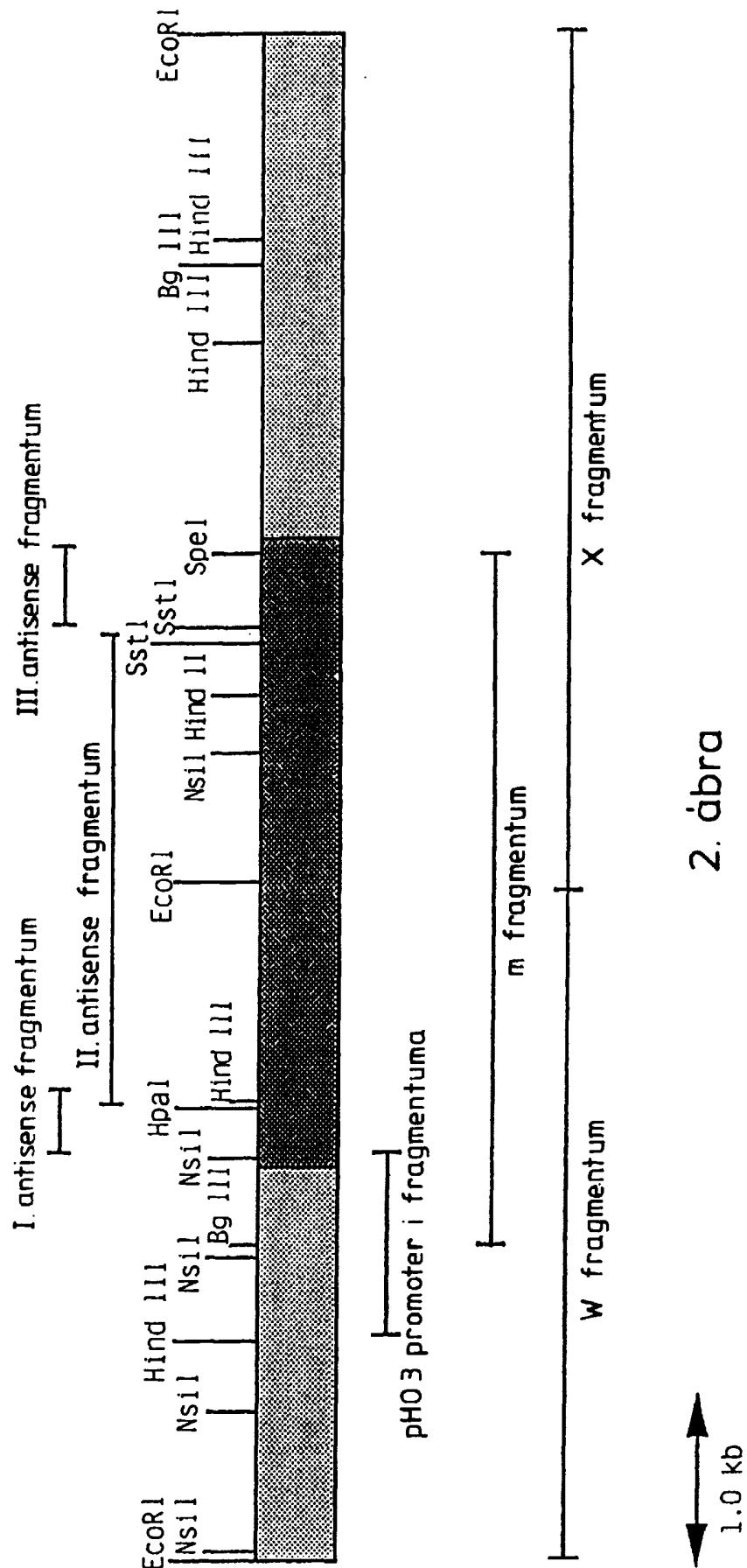
14. Burgonyagumó, *azzal jellemezve*, hogy genomja a 7–9. igénypontok szerinti antiszensz konstrukciók bármelyikét tartalmazza.

15. Burgonyanövény magja, *azzal jellemezve*, hogy a genomja a 7–9. igénypontok szerinti antiszensz konstrukciók bármelyikét tartalmazza.

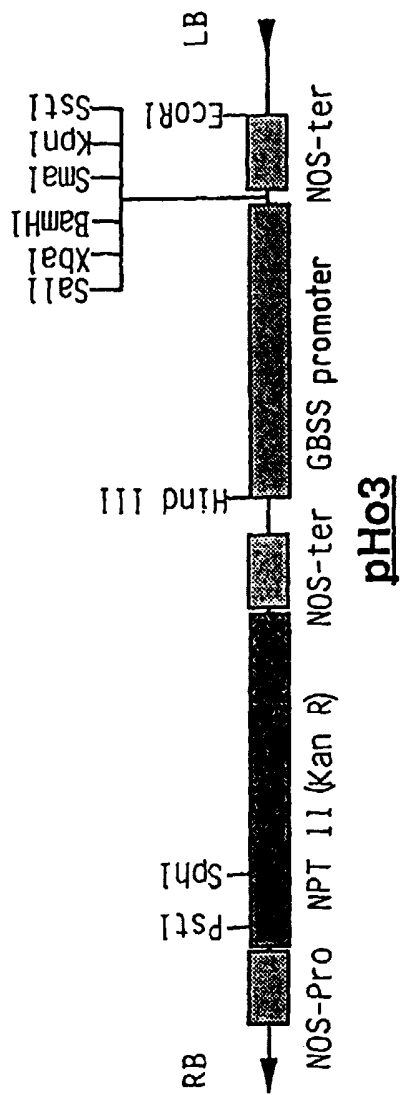
16. Burgonyamikrogumók, *azzal jellemezve*, hogy a genomja a 7–9. igénypontok szerinti antiszensz konstrukciók bármelyikét tartalmazza.



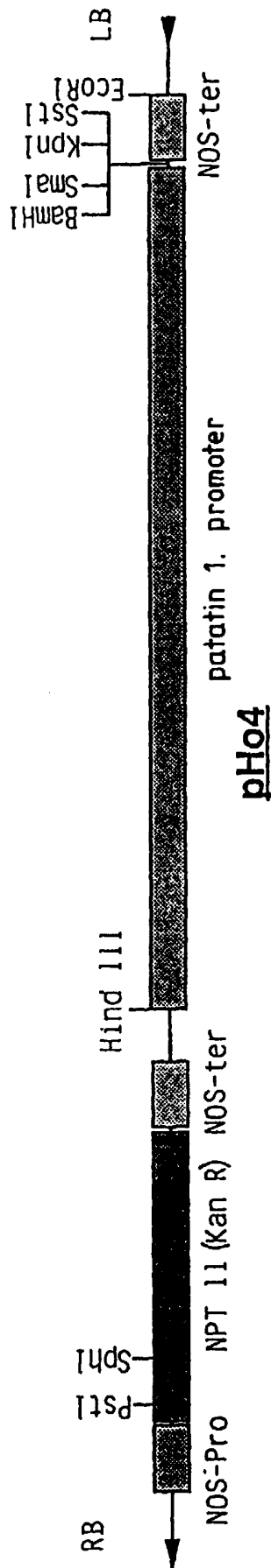
A restrikciós analízis eredménye, az intronokat is tartalmazó GBSS-t kódoló régiót sötétebb színnel jelöljük.



2. ábra

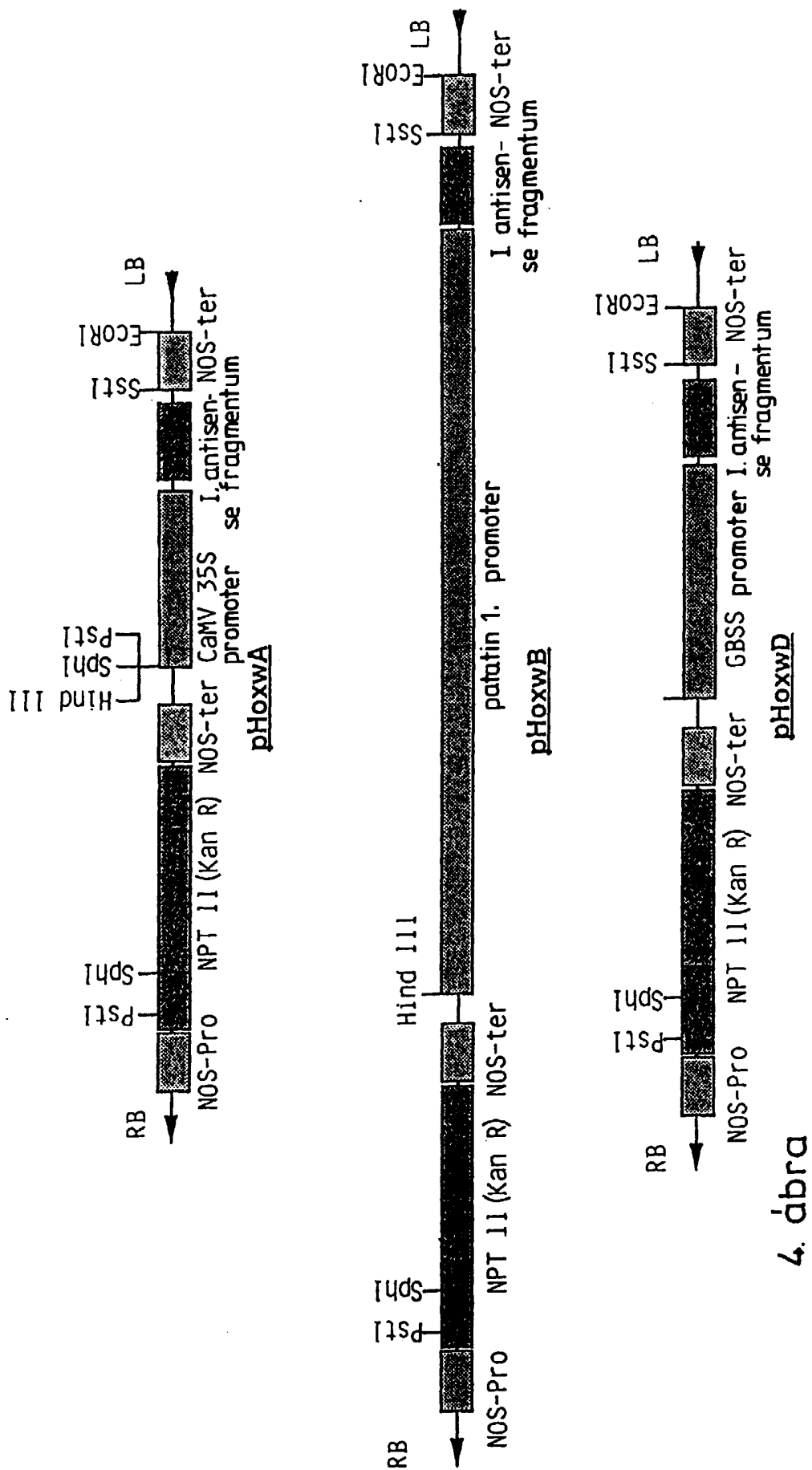


pHo3

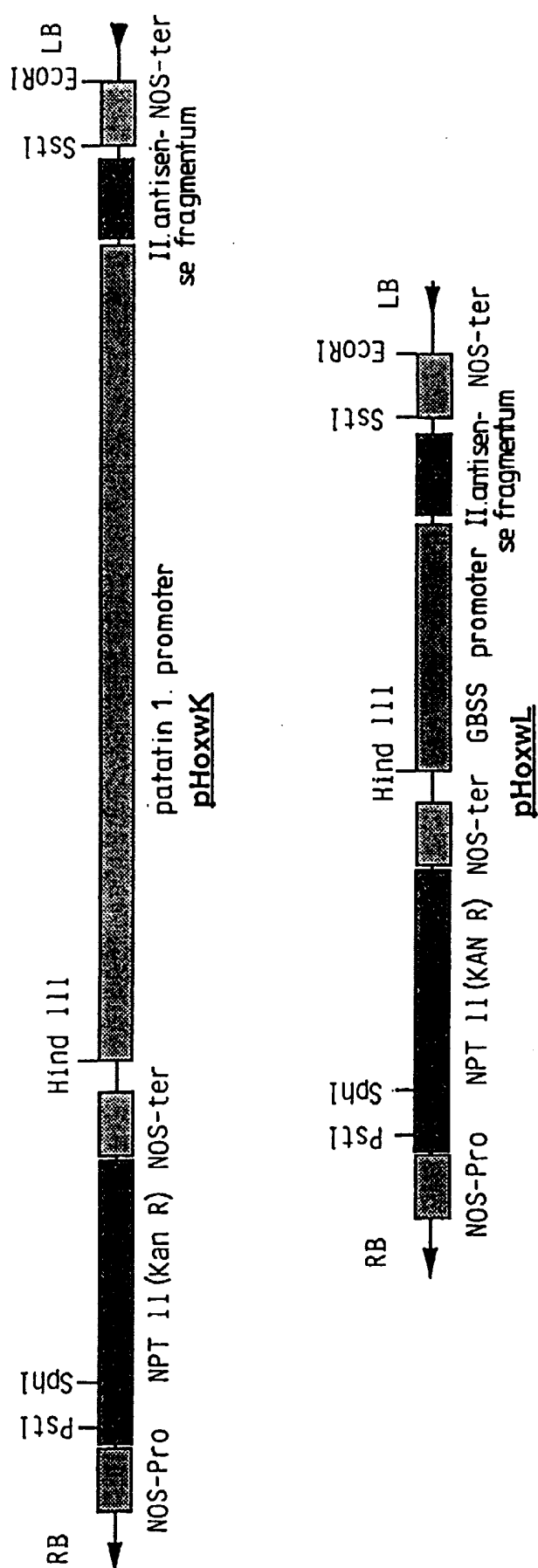


pHo4

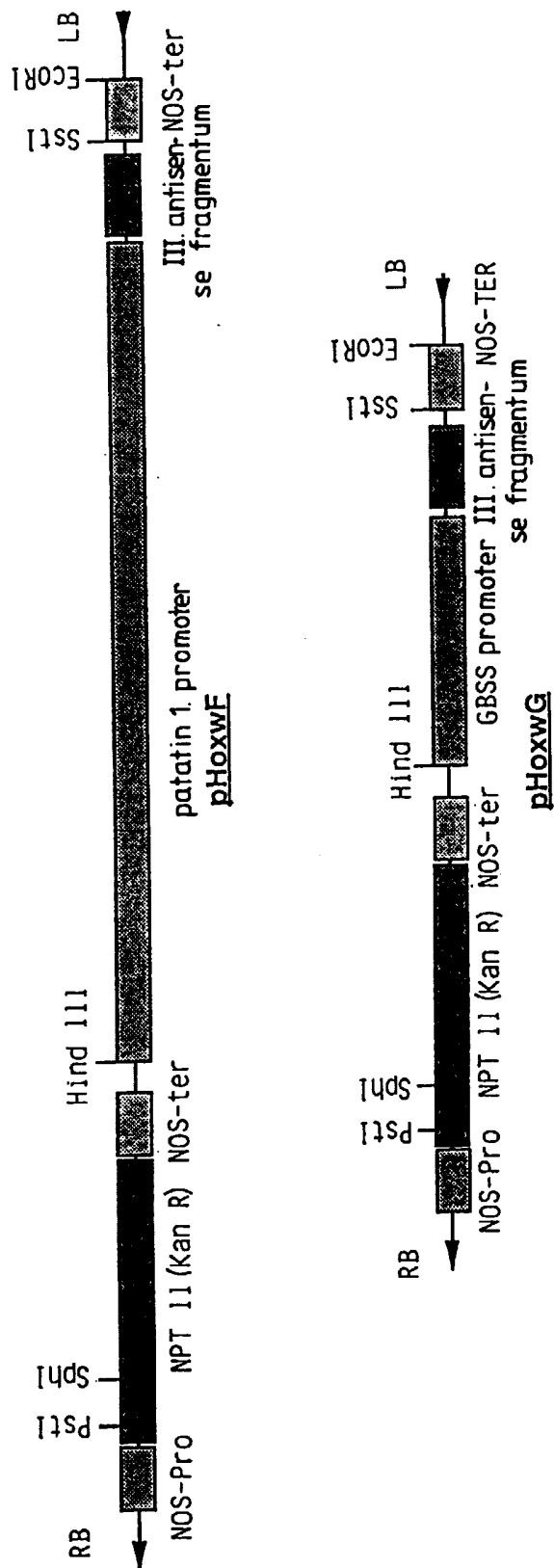
3. ábra



4. ábra



5. ábra



6. ábra