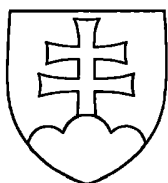


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: 7. 5. 1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 198 20 608.9
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 8. 5. 1998
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: DE
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 10. 7. 2001
Vestník ÚPV SR č.: 07/2001
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: PCT/EP99/03141
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: WO99/58690

(21) Číslo dokumentu:

1678-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

C12N 15/56,
C12N 9/44,
C12N 15/82,
C12N 1/21,
C12N 5/10,
A01H 5/00,
A01H 5/10,
C08B 30/00

(71) Prihlasovateľ: AVENTIS CROPS SCIENCE GMBH, Frankfurt, DE;

(72) Pôvodca: Loerz Horst, prof. Dr., Hamburg, DE;
Luetticke Stephanie, Dr., Hamburg, DE;
Abel Gernot, Dr., Kobenhaven, DK;
Genschel Ulrich, Dr., Hamburg, DE;

(74) Zástupca: Hörmannová Zuzana, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov: Molekuly nukleových kyselín kódujúce enzýmy z pšenice, ktoré sa podieľajú na syntéze škrobu

(57) Anotácia:
Sú opísané molekuly nukleových kyselín kódujúce enzýmy, ktoré sa podieľajú na syntéze škrobu v rastlinách. Tieto enzýmy zahŕňajú izoamylázy z pšenice. Tiež sú opísané vektory a hostiteľské bunky obsahujúce uvedené molekuly nukleových kyselín, najmä transformované rastlinné bunky a rastliny, ktoré je možné z týchto buniek regenerovať a ktoré majú zvýšenú alebo zníženú aktivitu izoamyláz podľa predloženého vynálezu.

SK 1678-2000 A3



MOLEKULY NUKLEOVÝCH KYSELÍN KÓDUJÚCE ENZÝMY Z PŠENICE, KTORÉ SA PODIEĽAJÚ NA SYNTÉZE ŠKROBU

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka molekúl nukleových kyselín, kódujúcich enzým z pšenice, ktorý sa podieľa na syntéze škrobu v rastlinách. Týmto enzýmom je izomyláza.

Ďalej sa tento vynález týka vektorov, hostiteľských buniek a rovnako rastlinných buniek a rastlín, ktoré obsahujú molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu.

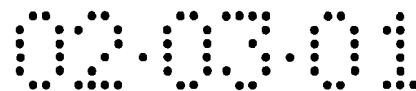
Ďalej je popísaný postup na získavanie transgénnych rastlín, ktoré po zavedení molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu syntetizujú škrob s niektorou pozmenenou vlastnosťou.

Doterajší stav techniky

V poslednej dobe neustále stúpa význam rastlinných obsahových látok ako obnoviteľných zdrojov surovín, a preto je jednou z úloh biotechnologického výskumu usilovať sa o prispôsobenie týchto rastlinných surovín požiadavkám spracovateľského priemyslu. Aby bola oblasť použiteľnosti týchto obnoviteľných surovín čo najširšia, je nevyhnutné dosiahnuť ich maximálnu rozmanitosť.

Polysacharidy predstavujú okrem olejov, tukov a proteínov dôležitú obnoviteľnú rastlinnú surovinu. Najdôležitejšie postavenie medzi polysacharidmi zaujíma okrem celulózy škrob, ktorý je jeden z hlavných zásobných látok vo vyšších rastlinách. Jednou z najdôležitejších kultúrnych rastlín je pšenica, z ktorej sa získava v Európskom spoločenstve 20 % z celkovej výroby škrobu.

Polysacharid škrob je polymérom, skladajúcim sa z chemicky jednotných základných jednotiek, a to z molekúl glukózy. Pritom ide o veľmi zložitú zmes rôznych molekulárnych foriem, ktoré sa líšia svojim polymerizačným stupňom, vetvením glukózových reťazcov a ich dĺžkou, a ktorú je okrem toho možné



derivatizovať, napríklad fosforylovať. To znamená, že škrob nie je jednotnou surovinou. Amylóza, ktorá je tvorená v podstate nerozvetveným polymérom, skladajúcim sa z 1,4-glykozidicky viazaných molekúl glukózy, sa odlišuje od amylopektínu, ktorý je tvorený komplexnou zmesou rôzne rozvetvených glukózových reťazcov. Na tomto rozvetvení sa podieľajú i 1,6-glykozidické väzby. Škrob syntetizovaný v pšenici obsahuje cca 11 až 37 % amylózy.

Aby bolo možné zaistiť použiteľnosť vhodných škrobov pre najrôznejšie priemyselné účely, je potrebné mať k dispozícii také rastliny, ktoré sú schopné syntetizovať modifikované škroby, ktoré by boli obzvlášť vhodné na rôzne účely použitia. Jedna z možností na získavanie takýchto rastlín sú šľachtiteľské opatrenia. Šľachtiteľské opatrenia sa však vzhľadom na polyploidný charakter pšenice (tetra- a hexaploid) uplatňujú veľmi ťažko. Iba nedávno sa podarilo krížením prírodných mutantov pšenice získať „voskovitú“ (neobsahujúcu amylózu) pšenicu (Nakamura a spol, Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 253 – 259).

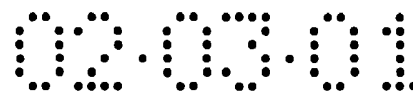
Alternatívou k šľachtiteľským opatreniam je cielená génovotechnologická modifikácia rastlín produkujúcich škrob. Predpokladom na to však je identifikácia a charakterizácia enzýmov, ktoré sa podieľajú na syntéze alebo na modifikácii škrobu a rovnako izolácia molekúl nukleových kyselín, ktoré tieto enzýmy kódujú.

Cesty biochemickej syntézy, vedúce k výstavbe škrobu, sú v podstate známe. Syntéza škrobu v rastlinných bunkách prebieha v plastidoch. Vo fotosynteticky aktívnych tkanivách sú to chloroplasty, vo fotosynteticky inaktívnych škrobových zásobných tkanivách to sú amyloplasty.

Na ďalšiu cielenú génovo-technickú premenu vetvenia škrobu syntetizovaného v rastlinách je stále nevyhnutné identifikovať DNA-sekvencie kódujúce enzýmy, ktoré sa na metabolizme škrobu podieľajú, najmä na rozvetvovaní reťazca alebo jeho odbúravaní.

Vedľa takzvaných Q-enzýmov, ktoré rozvetvenie do molekuly škrobu zavádzajú, sa v rastlinách vyskytujú enzýmy, ktoré môžu rozvetvenie odbúrať. Tieto enzýmy sa označujú ako Debranching-enzýmy a podľa ich substrátovej špecifičnosti sa delia do troch skupín :

(a) Pululanázy, ktoré okrem pululánu potrebujú ako substrát i amylopektín,



sa vyskytujú v mikroorganizmoch, napr. *Klebsiella*, a v rastlinách. V rastlinách sa tieto enzýmy označujú i ako R-enzýmy.

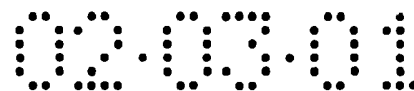
(b) Izoamylázy, ktoré nepotrebuje ako substrát pululán, ale glykogén a amylopektín, sa rovnako vyskytujú v mikroorganizmoch a v rastlinách. Izoamylázy boli popísané napr. v kukurici (Manners & Carbohydr. Res. 9 (1969), 107) a zemiakoch (Ishizaki a spol. Agric. Biol. Chem. 47 (1983), 771 – 779).

(c) Amylo-1,6-glukozidázy sú popisované pri cicavcoch a kvasinkách a potrebujú ako substrát hraničné dextríny.

Li a spol. (Plant Physiol. 98 (1992), 1277 – 1284) preukázali v cukrovej repe vedľa piatich endo- a dvoch exoamyláz iba jeden Debranching-enzým pululanázového typu. Tento enzým s veľkosťou cca 100 kD s optimálnym pH 5,5, je lokalizovaný v chloroplastoch. Rovnako pri špenáte bol popísaný jeden Debranching-enzým, ktorý ako substrát využíval pululán. Ako Debranching-enzým zo špenátu, tak i z cukrovej repy majú pri reakcii s amylopektínom ako substrátom v porovnaní s pululanom ako substrátom päťkrát nižšiu aktivitu (Ludwig a spol. Plant Physiol. 74 (1984), 856 – 861; Li a spol. (Plant Physiol. 98 (1992), 1277 – 1284).

U hospodársky významnej kultúrnej rastliny ukladajúcej škrob – u zemiakov - sledovali aktivitu Debranching-enzýmu Hobson a spol. (J. Chem. Soc, (1951), 1451). Títo autori preukázali, že príslušný enzým na rozdiel od Q-enzýmu nevykazuje pri predlžovaní reťazca žiadnu aktivitu, ale že iba hydrolyzuje alfa-1,6-glykozidické väzby. Tento enzým však doposiaľ nebolo možné podrobnejšie charakterizovať. V zemiakoch bol už postup na čistenie Debranching-enzýmu a rovnako parciálnych peptidových sekvencií čisteného proteínu navrhnutý (WO 95/04826). Pri špenáte bolo medzitým popísané čistenie Debranching-enzýmu a rovnako izolácia príslušnej cDNA (Renz a spol., Plant Physiol. 108 (1995), 1342).

O kukurici bola v literatúre dosiaľ popísaná iba existencia jedného Debranching-enzýmu. Tento enzým bol podľa svojej substrátovej špecifčnosti zaradený do skupiny izoamyláz (pozri napr. Hannah a spol., Scientia Horticulturae 55 (1993), 177 – 197 alebo Garwood (1984) v publikácii Starch



Chemistry and Technology, Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Puschall, E.F. (eds.). Academic Press San Diego, New York, Boston, 25-86). Príslušné mutanty boli označené ako cukrové (sugary). Tento gén cukrového centra (sugary-Locus) bol krátko klonovaný (pozri James a spol., Plant Cell 7 (1995), 417-429). Okrem centra sugary-Locus nebolo v kukurici preukázané žiadne iné génové centrum (Genlocus), ktoré by kódovalo proteín s Debranching-enzýmovou aktivitou. Doposiaľ neexistujú ani žiadne dôkazy o tom, že by sa v kukurici vyskytovali iné formy Debranching-enzýmov. Na získanie transgéennej rastliny kukurice, ktorá by nemala žiadnu Debranching-enzýmovú aktivitu, napríklad na dosiahnutie vyššieho stupňa rozvetvenia amylopektínu, je nevyhnutné identifikovať všetky formy Debranching-enzýmu ktoré sa v kukurici vyskytujú a izolovať príslušné gény alebo cDNA-sekvencie.

Na získanie ďalších možností na uskutočnenie premien akýchkoľvek škrobnatých rastlín, prednostne obilia, a najmä pšenice tak, aby tieto rastliny syntetizovali modifikovaný škrob, je potrebné identifikovať príslušné DNA-sekvencie, ktoré kódujú ďalšie izoformy enzýmov, ovplyvňujúce rozvetvenie reťazca.

Podstata vynálezu

Cieľom tohto predkladaného vynálezu je príprava molekúl nukleových kyselín, ktoré kódujú enzýmy, podieľajúce sa na biosyntéze škrobu a ich pomocou získavanie génovo-technicky modifikovanej rastliny, ktoré umožnia výrobu rastlinných škrobov so zmenenými chemickými a/alebo fyzikálnymi vlastnosťami.

Tento vynález sa teda týka molekúl nukleových kyselín ktoré proteín s funkciou izoamylázy z pšenice kódujú, predovšetkým proteínu, ktorý je definovaný najmä aminokyselinovou sekvenciou uvedenou pod Seq ID No. 3 alebo 7. Tento vynález sa najmä týka molekuly nukleových kyselín, ktorá obsahuje nukleotidovú sekvenciu uvedenú pod Seq ID No.1, 2 alebo 6 alebo jej časť, prednostne molekulu obsahujúcu kódujúcu oblasť uvedenú v Seq ID No. 1, 2 alebo 6 a rovnako príslušné ribonukleotidové sekvencie. Obzvlášť výhodná



je molekula nukleových kyselín obsahujúca ďalšie regulačné prvky, ktoré uskutočňujú transkripciu a rovnako prípadne transláciu uvedených molekúl nukleových kyselín.

Ďalej sa tento vynález týka molekúl nukleových kyselín, ktoré sa s niektorými molekulami nukleových kyselín podľa tohto vynálezu hybridizujú.

Predmetom tohto vynálezu je i molekula nukleových kyselín, ktorá kóduje izomylázu z pšenice a ktorej sekvencia, sa na základe degenerácie genetického kódu líši od nukleotidovej sekvencie vyššie uvedených molekúl.

Tento vynález sa týka i molekuly nukleových kyselín, ktorá obsahuje sekvenciu komplementárnu s úplnými vyššie uvedenými sekvenciami alebo s ich časťami.

Pojem „hybridizácia“ znamená v rámci tohto vynálezu hybridizáciu za konvenčných hybridizačných podmienok, výhodne za prísne definovaných podmienok, popísaných napríklad v publikácii Sambrook a spol., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vyd. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Obzvlášť výhodne sa „hybridizácia“ uskutočňuje za nasledujúcich podmienok :

Hybridizačný pufor : 2 x SSC; 10 x roztok Denhardt (Fikoll 400 + PEG + BSA; pomer 1 : 1 : 1); 0,1 % SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄ ; 250 µg/ml DNA sledích spermíí (Heringssperma-DNA); 50 µg/ml tRNA; alebo 0,25 M natriumfosfátový pufor pH 7,2; 1 mM EDTA; 7 % SDS

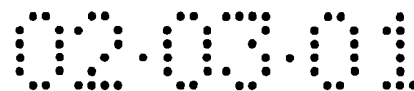
Hybridizačná teplota : T = 65 až 70 ° C

Premývací pufor : 0,2 x SSC; 0,1 % SDS

Premývacia teplota : T = 40 až 75 °C.

Molekuly nukleových kyselín, hybridizované s molekulami nukleových kyselín podľa tohto vynálezu môžu principiálne kódovať izomylázy z akejkoľvek rastliny pšenice, ktorá tieto proteíny exprimuje.

Molekuly nukleových kyselín, hybridizované s molekulami nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, môžu byť napríklad izolované z genomických



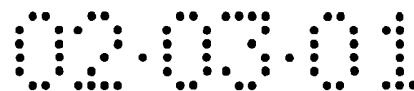
pšeníc alebo pšeničných tkanív alebo z cDNA-knižníc pšeníc alebo pšeničných tkanív. Alternatívne môžu byť pripravené génovo-technickými metódami alebo chemickou syntézou.

Identifikáciu a izoláciu týchto molekúl nukleových kyselín je možné uskutočňovať s použitím molekúl podľa tohto vynálezu alebo časti týchto molekúl respektíve s použitím reverzných komplementov týchto molekúl, napríklad pomocou hybridizácie podľa štandardného postupu (pozri napríklad Sambrook a spol., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Ako vzorku pre hybridizáciu je možné použiť napríklad molekuly nukleových kyselín, obsahujúce presne rovnaké alebo v podstate rovnaké nukleotidové sekvencie alebo ich časti, uvedené pod Seq ID No. 1, 2 alebo 6. Pri týchto fragmentoch, použitých ako vzorka pre hybridizáciu, môže ísť i o syntetické fragmenty pripravené pomocou bežných syntetických techník, ktorých sekvencia v podstate zodpovedá molekulám nukleových kyselín podľa tohto vynálezu.

Molekuly, hybridizované s molekulami nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, zahrňujú i fragmenty, deriváty a alelické varianty vyššie uvedených molekúl nukleových kyselín, ktoré kódujú pšeničné izomylázy podľa tohto vynálezu. Fragmentami sa pritom rozumejú časti molekúl nukleových kyselín, ktoré sú dostatočne dlhé na to, aby boli schopné kódovať uvedené proteíny. Výraz „derivát“ v tejto súvislosti znamená, že sekvencia týchto molekúl sa od sekvencií vyššie uvedených molekúl nukleových kyselín líšia na jednom alebo niekoľkých miestach a že vykazujú vysoký stupeň homológie s týmito sekvenciami. Homológia znamená identitu sekvencie minimálne zo 40 %, najmä identitu minimálne zo 60 %, obzvlášť nad 80 % a obzvlášť výhodne nad 90 %. Odchýlky od skôr popísaných molekúl nukleových kyselín môžu vznikáť vyštiepením, substitúciou, inzerciou alebo rekombináciou.

Homológia ďalej znamená, že existuje funkčná a/alebo štruktúrna ekvivalencia medzi príslušnými molekulami nukleových kyselín alebo nimi kódovanými proteínmi. Pri molekulách nukleových kyselín, ktoré sú homologické s vyššie uvedenými molekulami a predstavujú deriváty týchto



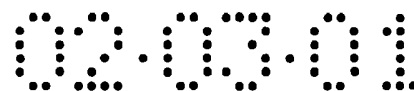
molekúl, ide spravidla o variácie týchto molekúl, ktoré predstavujú modifikácie s rovnakými biologickými funkciami. Pritom môže ísť ako o prirodzene sa vyskytujúce variácie, napríklad o sekvencie z iných organizmov, tak o mutanty, pričom tieto mutanty môžu mať prirodzený výskyt alebo môžu byť zavádzané cieľenou mutagenézou. Ďalej ide o variácie synteticky pripravených sekvencií. Pri alelických variantoch môže ísť ako o varianty s prirodzeným výskytom, tak i o varianty pripravené synteticky alebo získané rekombinantnou DNA-technikou.

Izoamylázy, kódované rôznymi variantami molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, vykazujú určité spoločné vlastnosti. K nim patria napríklad enzýmová aktivita, molekulová hmotnosť, imunologická reaktivita, konformácie a podobne a rovnako fyzikálne vlastnosti, ako je napríklad pohyblivosť pri gélovej elektroforéze, chovanie pri chromatografii, sedimentačné koeficienty, rozpustnosť, spektroskopické vlastnosti, elektrický náboj, stabilita; pH-optimum, teplotné optimum a podobne.

Proteínom, kódovaným molekulami nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, je izomyláza z pšenice. Tieto proteíny vykazujú určité homologické oblasti s doteraz známymi izoamylázami z iných rastlinných druhov.

Molekulami nukleových kyselín podľa tohto vynálezu môžu byť DNA-molekuly, najmä cDNA alebo genomické molekuly. Ďalej môžu byť nukleovými kyselinami podľa tohto vynálezu RNA-molekuly, ktoré môžu vzniknúť napríklad transkripciou niektorej molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu. Nukleové kyseliny podľa tohto vynálezu môžu byť napríklad získavané z prírodných zdrojov alebo technikou rekombinácie či synteticky.

Predmetom tohto vynálezu sú i oligonukleotidy špecificky hybridizované s niektorou molekulou nukleových kyselín podľa tohto vynálezu. Tieto oligonukleotidy majú výhodne dĺžku minimálne 10, obzvlášť minimálne 15 a obzvlášť výhodne dĺžku minimálne 50 nukleotidov. Oligonukleotidy podľa tohto vynálezu sa vyznačujú tým, že sa hybridizujú špecificky s molekulami nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, to znamená, že so sekvenciami nukleových kyselín, ktoré kódujú iné proteíny, najmä iné izoamylázy, nepodliehajú hybridizácii alebo sa hybridizujú iba v nepatrnom rozsahu. Oligonukleotidy podľa tohto vynálezu môžu byť použité napríklad ako primér



pre PCR-reakciu alebo ako hybridizačná vzorka na izoláciu príbuzných génov. Môžu tvoriť i súčasť antisense-konštruktov alebo molekúl DNA, kódujúcich vhodný ribozým.

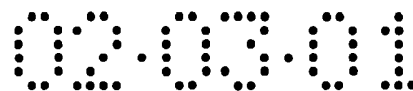
Tento vynález ďalej zahrňuje vektory, najmä plazmidy, kozmidy, fagemidy, vírusy, bakteriofágy a ďalšie vektory, bežné v génovej technike, ktoré v sebe obsahujú vyššie uvedené molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu. Tieto vektory sú vhodné na transformáciu prokaryotických alebo eukaryotických, výhodne rastlinných buniek.

Obzvlášť výhodné sú vektory, umožňujúce integráciu molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu do genómu rastlinnej bunky, prípadne spolu s tieniacimi regulačnými oblasťami. Ako príklady je možné uviesť binárne vektory, ktoré je možné použiť pri transfere génov sprostredkovanom agrobaktériami. Výhodná je syntéza prenositeľných alebo prípadne neprenositeľných molekúl nukleových kyselín v transformovaných pro- alebo eukaryotických bunkách integráciou molekuly nukleových kyselín v sense- alebo antisense-orientácii podľa tohto vynálezu.

Pojem „vektor“ označuje všeobecne vhodný, odborníkom známy, pomocný prostriedok, umožňujúci cieleň transfer jednej jedno- alebo dvojláknovej molekuly nukleovej kyseliny do hostiteľskej bunky, ako sú napr. DNA-alebo RNA-vírus, fragment vírusu, plazmidový konštrukt ktorý za prítomnosti alebo neprítomnosti regulačných prvkov môže byť vhodný na transfer nukleových kyselín do buniek, nosné materiály ako sú sklené vlákna alebo i častice kovov, používané napríklad pri postupe „particle gun“ („vstrelovanie častíc“), môže však ísť o molekulu nukleových kyselín, ktorú je možné vložiť priamo do bunky vhodným chemickým alebo fyzikálnym postupom.

Pri výhodnom spôsobe uskutočnenia sú molekuly nukleových kyselín, obsiahnuté vo vektoroch, viazané s regulačnými prvkami, ktoré umožňujú transkripciu a syntézu prenositeľnej RNA do pro- alebo eukaryotických buniek alebo – pokiaľ je to žiadúce – ktoré umožňujú syntézu neprenositeľnej RNA.

Expresia molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu v prokaryotických bunkách, napríklad v *Escherichia coli*, má význam pre



presnejšiu charakterizáciu enzymatickej aktivity enzýmov, ktoré kódujú tieto molekuly. Obzvlášť je možné charakterizovať produkt, syntetizovaný príslušnými enzýmami za neprítomnosti iných enzýmov, podieľajúcich sa na syntéze škrobu v rastlinných bunkách. To umožňuje vyvodzovať závery o funkcii príslušného proteínu pri syntéze škrobu v rastlinných bunkách.

Okrem toho je možné pomocou bežných postupov molekulárnej biológie (pozri napríklad Sambrook a spol., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) zavádzať rôzne mutácie do molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, pričom sa pri tejto syntéze získajú proteíny s prípadne premenenými biologickými vlastnosťami. To umožňuje prípravu delečných mutantov, v ktorých postupným vyštepovaním z 5'- alebo 3'- konca je možné získať kódujúcu DNA-sekvenciu molekúl nukleových kyselín, ktoré vedú k syntéze príslušných skrátených proteínov. Táto delécia na 5'-konci nukleotidovej sekvencie umožňuje napríklad identifikovať aminokyselinové sekvencie, ktoré spôsobujú translokáciu enzýmov v plastidoch (transitpeptidy). To umožňuje uskutočňovať ciele prípravu enzýmov, ktoré po odstránení príslušných sekvencií už nie sú lokalizované v plastidoch, ale v cytosole, alebo ktoré sú po adícii iných signálnych sekvencií lokalizované v iných častiach bunky.

Ďalej je možné uskutočňovať zavádzanie lokálnych mutácií do pozícií, v ktorých zmena aminokyselinovej sekvencie ovplyvňuje napríklad enzymovú aktivitu alebo reguláciu enzýmu. Týmto spôsobom je možné napríklad získať mutanty so zmenenou hodnotou K_m alebo mutanty, ktoré už nepodliehajú normálnym regulačným mechanizmom v bunke pôsobením alosterickej regulácie alebo kovalentnej modifikácie.

Ďalej je možné získať mutanty proteínov podľa tohto vynálezu, ktoré majú zmenenú substrátovú alebo produktovú špecifičnosť. Okrem toho je možné pripravovať mutanty proteínov, ktoré vykazujú zmenený profil aktivity – teplota.

Pri uskutočňovaní génovo-technickej modifikácie prokaryotických buniek je možné vkladať molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu alebo ich častí do plazmidov, ktoré umožňujú uskutočňovať mutagenézu alebo zmenu

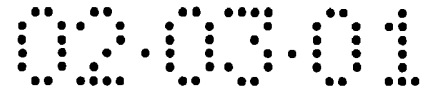


sekvencie rekombináciou DNA-sekvencií. Pomocou štandardných postupov (viď Sambrook a spol., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) je možné uskutočňovať zámenny báz alebo pripojovať prirodzené alebo syntetické sekvencie. Na vzájomné spávanie DNA-fragmentov je možné k týmto fragmentom pripojiť spojovacie alebo viažuce skupiny (Adaptoren o. Linker). Rovnako je možné používať manipulácie, ktoré uvoľňujú príslušné reštrikčné miesta štiepenia, alebo ktoré nadbytočnú DNA alebo reštrikčné miesta odstraňujú. V prípadoch, kde prichádzajú do úvahy inzercie, delécie alebo substitúcie, je možné pri mutagenéze in vitro používať „primer repair“, reštrikciu alebo ligáciu. Ako analytické metódy boli všeobecne použité sekvenčná analýza, reštrikčná analýza alebo iné biochemické alebo molekulárno-biologické metódy.

V ďalších formách uskutočňovania sa tento vynález týka hostiteľských buniek, najmä pro- alebo eukaryotických buniek, ktoré sú transformované s jednou z vyššie uvedených molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu alebo s jedným z vektorov podľa tohto vynálezu, a rovnako buniek, ktoré z takto transformovaných buniek vznikajú a obsahujú molekulu nukleových kyselín podľa tohto vynálezu alebo vektor. Pritom prednostne ide o pro- alebo eukaryotické bunky, najmä o rastlinné bunky.

Premetom tohto vynálezu sú ďalej proteíny, ktoré je možné pripraviť rekombinantným spôsobom, a ktoré majú aktivitu izomylázy, kódovanej molekulami nukleových kyselín podľa tohto vynálezu a rovnako postup ich prípravy, pričom hostiteľská bunka podľa tohto vynálezu je kultivovaná za vhodných, odborníkom známych podmienok, umožňujúcich syntézu proteínu podľa tohto vynálezu a konečná izolácia tohto proteínu z hostiteľských buniek a/alebo z kultivačného média.

Molekuly nukleových kyselín, získané podľa tohto vynálezu, teraz umožňujú pomocou génovo-technických metód uskutočňovať ciele zásahy do metabolizmu škrobu v rastlinách a tento metabolizmus meniť do tej miery, že dôjde k syntéze takých modifikovaných škrobov, ktoré v porovnaní so známymi škrobmi budú mať iné fyzikálno-chemické vlastnosti, ako sú napríklad

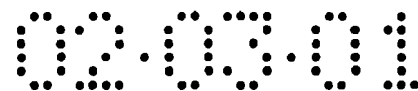


pomer amylyózy a amylopektínu, stupeň rozvetvenia reťazca, priemerná dĺžka reťazca, obsah fosfátov, vlastnosti pri mazovaní, vlastnosti pri tvorbe gélu alebo filmu, veľkosť škrobových zŕn a/alebo ich tvar.

Je možné rovnako uskutočňovať expresiu molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu v rastlinných bunkách na zvýšenie aktivity príslušnej izomylázy, alebo zavádzať molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu do buniek, ktoré tento enzým normálne neexprimujú. Expresia molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu poskytuje i možnosť znížiť prirodzenú aktivitu izoamylázy podľa tohto vynálezu v rastlinných bunkách. Ďalej je možné molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu modifikovať postupmi, ktoré sú odborníkom známe, aby sa získali izoamylázy podľa tohto vynálezu, ktoré už nepodliehajú prirodzeným regulačným mechanizmom vlastnej bunky, respektíve ktoré majú zmenený profil teplota – aktivita alebo zmenené špecifické vlastnosti substrátu respektíve produktu.

Pri expresii molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu v rastlinách existuje v zásade možnosť lokalizovať syntetizovaný proteín do ľubovoľnej časti rastlinnej bunky. Aby bolo možné uskutočniť lokalizáciu do určitej časti rastlinnej bunky, musí sa vyštiepiť sekvencia zaisťujúca lokalizáciu v plastidoch a zostávajúcu kódujúcu oblasť prípadne spojiť s DNA-sekvenciami, ktoré zaisťujú lokalizáciu do príslušného miesta. Takéto sekvencie sú známe (pozri napr. Braun a spol., EMBO J. 11 (1992), 3219 – 3227; Wolter a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846 -850; Sonnenwald a spol., Plant J. 1 (1991), 95 – 106).

Tento vynález sa týka i postupu prípravy transgénnych rastlinných buniek, ktoré sa transformujú s molekulou nukleových kyselín alebo s vektorom podľa tohto vynálezu, pričom molekula nukleových kyselín podľa tohto vynálezu alebo vektor podľa tohto vynálezu sa integruje do genómu rastlinnej bunky, a ďalej sa týka i transgénnych rastlinných buniek, transformovaných pomocou niektorej molekuly nukleových kyselín alebo vektora podľa tohto vynálezu, a rovnako zahŕňa transgénne rastlinné bunky, ktoré sú z takto transformovaných buniek odvodené. Bunky podľa tohto vynálezu obsahujú jednu alebo viac molekúl nukleových kyselín alebo vektorov podľa tohto



vynálezu, pričom tieto molekuly alebo vektory sú prednostne spojené s regulačnými DNA- prvkami, ktoré zaisťujú transkripciu v rastlinných bunkách, najmä s vhodným promótorom. Tieto bunky je možné odlišiť od prirodzených rastlinných buniek mimo iného i podľa toho, že obsahujú molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, ktoré sa v týchto bunkách normálne nevyskytujú, alebo podľa toho, že takáto molekula je integrovaná na určitom mieste genómu bunky, kde sa inak nevyskytuje, teda v inom genomickom okolí. Ďalej je možné tieto transgénne rastlinné bunky podľa tohto vynálezu odlišiť od prirodzených rastlinných buniek tým, že tieto bunky obsahujú vo svojom genóme stabilne integrovanú minimálne jednu kópiu molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, prípadne navyše ku kópiám tejto molekuly s prirodzeným výskytom v bunkách. Ak ide v molekule (molekul) nukleových kyselín zavedených do buniek, o kópie navyše k molekulám s prirodzeným výskytom v bunke, je možné rastlinné bunky podľa tohto vynálezu od prirodzených buniek odlišiť najmä tým, že táto (tieto) kópie navyše je (sú) lokalizované v genóme na mieste (miestach), na ktorých sa v prírode nevyskytuje (nevyskytujú). To je možné ľahko dokázať napríklad pomocou Southern-Blot-analýzy podľa postupov, ktoré sú odborníkom známe.

Ak je molekula nukleových kyselín podľa tohto vynálezu zavedená do rastlinného genómu vo vzťahu k rastlinnej bunke heterológna, obsahujú transgénne rastlinné bunky transkripty molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, čo je možné ľahko preukázať napr. Northern-Blot-analýzou podľa postupov, ktoré sú odborníkom známe.

Ak je molekula nukleových kyselín podľa tohto vynálezu homológna vo vzťahu k rastlinnej bunke, je možno bunky podľa tohto vynálezu odlišiť od prirodzene sa vyskytujúcich buniek napríklad podľa ďalšej expresie molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu. Transgénne rastlinné bunky obsahujú výhodne viac transkriptov molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu. To je možné dokázať napríklad pomocou Northern-Blot-analýzy. „Viac“ znamená pri tom výhodne minimálne o 10 % viac, obzvlášť o 20 % viac a predovšetkým minimálne o 50 % viac transkriptov ako zodpovedajúce netransformované bunky. Prednostne vykazujú tieto bunky rovnako zodpovedajúce (minimálne 10



%, 20 % alebo 50 %) zvýšenie aktivity alebo prípadne zníženie aktivity proteínov podľa tohto vynálezu. Transgénne rastlinné bunky je možné regenerovať na celé rastliny pomocou postupov, ktoré sú odborníkom známe.

Predmetom tohto vynálezu je i postup získavania transgénnych rastlín, pričom jedna alebo niekoľko molekúl nukleových kyselín alebo vektorov podľa tohto vynálezu sa integruje do genómu rastlinnej bunky a celá rastlina sa z tejto bunky regeneruje. Ďalej sú predmetom tohto vynálezu rastliny, ktoré vyššie uvedené transgénne rastlinné bunky obsahujú. Tieto transgénne rastliny môžu byť principiálne rastliny akéhokoľvek rastlinného druhu, to znamená ako rastliny monokotylné, tak i dikotylné. Prednostne ide o úžitkové rastliny, obzvlášť o rastliny ktoré syntetizujú alebo ukladajú škrob, obzvlášť výhodne žito, jačmeň, ovos, pšenica, proso, ságo, kukurica, ryža, hrach, dreňový hrach, maniok, zemiaky, poradajky, repka, sójové boby, konope, ľan, slnečnica, krmný hrach alebo maranta a predovšetkým pšenica, kukurica, ryža a zemiaky.

Tento vynález sa rovnako týka množiteľského materiálu rastlín podľa tohto vynálezu, ako sú napríklad plody, semená, hľúzy, časti koreňov, semenáče, sadenice, pletivá protoplasty, bunkové kultúry a podobne.

Tento predkladaný vynález sa ďalej týka spôsobu výroby modifikovaného škrobu, zahrňujúci operáciu extrakcie škrobu z vyššie uvedených rastlín podľa tohto vynálezu a/alebo zo škrobnatých častí týchto rastlín.

Postupy pre extrakciu škrobu z rastlín alebo z ich škrobnatých častí, najmä z pšenice, sú odborníkom známe, pozri napríklad Eckhoff a spol. (Cereal Chem. 73 (1996) 54 – 57 „Starch – Chemistry and Technology (vydavateľ : Whistler, BeMiller a Paschall (1994), 2. vydanie, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; pozri napr. kapitola XII, str. 412 – 368; Škroby z kukurice a sorghumu: Výroba; Watson; kapitola XIII, str. 469 – 479; Tapiokový, marantový a ságový škrob: Výroba; Corbishley a Miller; kapitola XIV, str. 479 – 490; Zemiakový škrob: Výroba a použitie; Mitch; kapitola XV, str. 491 – 506; Pšeničný škrob: Výroba, modifikácia a použitie; Knight a Oson; a kapitola XVI. str. 507 až 528: Ryžový škrob: Výroba a použitie ; Rohmer a Klem). K zariadeniam, ktoré sa spravidla na extrakciu škrobu z rastlinného materiálu používajú, patria separátory, dekantéry, hydrocyklony, sprayové

sušiarne a sušiarne na sušenie vo fluidnej vrstve.

Transgénne rastlinné bunky a rastliny podľa tohto vynálezu syntetizujú na základe expresie molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu škroby, ktoré so svojimi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ako je napríklad pomer amylozy a amylopektínu, stupeň rozvetvenia reťazca, priemerná dĺžka reťazca, obsah fosfátov, vlastnosti pri mazovaní, veľkosť škrobových zŕn a/alebo ich tvar, líšia od škrobov syntetizovaných prírodnými rastlinami. V týchto škroboch sa môže meniť najmä ich viskozita a/alebo ich vlastnosti pri tvorbe filmu a vlastnosti vzniknutých škrobových mazov v porovnaní s vlastnosťami známych škrobov.

Predmetom tohto predkladaného vynálezu je ďalej škrob, ktorý je možné získať z rastlinných buniek, rastlín a z ich množiteľského materiálu podľa tohto vynálezu a škrob, ktorý je možné získať vyššie uvedenými postupmi podľa tohto vynálezu.

Ďalej je možné pomocou molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu produkovať rastlinné bunky a rastliny, v ktorých je aktivita proteínu podľa tohto vynálezu znížená. To vedie rovnako k syntéze škrobu so zmenenými chemickými a/alebo fyzikálnymi vlastnosťami v porovnaní so škrobmi z pôvodných rastlinných buniek.

Ďalším predmetom tohto vynálezu sú transgénne rastlinné bunky, obsahujúce molekulu nukleových kyselín podľa tohto vynálezu, v ktorých je aktivita izoamylázy v porovnaní s netransformovanými bunkami znížená.

Prípravu rastlinných buniek so zníženou aktivitou izoamylázy je možné uskutočňovať napríklad expresiou príslušnej anti-sense-RNA, sense-RNA na dosiahnutie ko-supresného efektu alebo expresiou zodpovedajúcim spôsobom konštruovaného ribozýmu, ktorý špecificky štiepi transkript kódujúci izoamylázu s použitím molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu podľa postupu, ktorý je odborníkom známy, viď Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340 – 344), Niebel a spol., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91 - 103), Flavell a spol. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43 – 46), Palaqui a Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149 – 159), Vaucheret a spol. (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311 – 317), de Borne a spol., (Mol. Gen. Genet. 243

(1994), 613 – 621).

Prednostne sa na zníženie aktivity izoamylázy podľa tohto vynálezu používa zníženie počtu kódujúcich transkriptov v rastlinných bunkách, napríklad expresiou antisense-RNA.

Pri tom je možné použiť molekulu DNA, ktorá obsahuje úplnú sekvenciu kódujúcu proteín podľa tohto vynálezu vrátane prípadne prítomných tieniacich sekvencií, a rovnako DNA-molekuly, obsahujúce iba časti kódujúcej sekvencie, pričom tieto časti musia byť dostatočne dlhé na to, aby v bunkách vyvolali antisense-efekt. Všeobecne sa môžu požívať sekvencie s minimálnou dĺžkou 15 bp, výhodne s dĺžkou 100 – 500 bp, na účinnú antisense-inhibíciu najmä sekvencie s dĺžkou nad 500 bp. Spravidla sa používajú DNA-molekuly, ktoré sú kratšie ako 5000 bp, výhodne sekvencie, ktoré sú kratšie ako 2500 bp.

Je možné používať i DNA-sekvencie, ktoré vykazujú vysoký stupeň homológie so sekvenciami molekúl DNA podľa tohto vynálezu, ktoré však nie sú celkom identické. Minimálna homológia by mala byť vyššia ako cca 65 %. Prednostne sa používajú sekvencie so stupňom homológie medzi 95 a 100 %.

Predmetom tohto vynálezu je i postup prípravy modifikovaného škrobu, zahrňujúci postup extrakcie škrobu z bunky alebo z rastliny podľa tohto vynálezu a/alebo zo škrobnatých častí týchto rastlín.

Predmetom tohto vynálezu je ďalej škrob, ktorý je možné získať z buniek, rastlín a rovnako množiteľského materiálu alebo jeho častí podľa tohto vynálezu a ďalej škrob, ktorý je možné získať postupom podľa tohto vynálezu.

Škroby podľa tohto vynálezu je možné modifikovať postupmi, ktoré sú odborníkom známe, pričom tieto škroby v modifikovanej alebo nemodifikovanej forme sú vhodné na rôzne použitie v potravinárskej alebo nepotravinárskej oblasti.

Možnosti použitia škrobov podľa tohto vynálezu sa v podstate delia do dvoch veľkých oblastí. Jedna oblasť zahrňuje produkty hydrolýzy škrobu, najmä glukózu a glukánové stavebné jednotky, ktoré je možné získať enzymatickými alebo chemickými postupmi. Tieto látky slúžia ako východiskové suroviny pre ďalšie chemické modifikácie a procesy, ako je napríklad fermentácia. Na

zníženie finančných nákladov môže mať v tomto prípade značný význam jednoduchosť a nie príliš nákladné uskutočnenie hydrolytického postupu. V súčasnej dobe sa táto hydrolýza uskutočňuje prevažne enzymaticky s použitím amyloglukozidázy. Možno predpokladať, že úspora nákladov by sa mohla dosiahnuť znížením množstva použitých enzýmov. Určitý vplyv by mohla mať i štruktúrna premena škrobu, ako je napríklad zníženie stupňa rozvetvenia alebo zmena sterickej štruktúry, ktorá určuje prístupnosť molekuly pre použité enzýmy.

Druhá oblasť, v ktorej by sa škroby podľa tohto vynálezu mohli vzhľadom na ich polymerizačnú štruktúru používať ako takzvané natívne škroby, sa delia na dve hlavné oblasti použitia:

1. Potravinársky priemysel

Škrob je klasickou prísadou do radu potravín, v ktorých spravidla plní funkciu spojiva pre vodné zložky alebo sa používa na zvýšenie viskozity alebo spôsobuje zvýšenú tvorbu gélu. Dôležitými vlastnosťami sú pritom tekutosť a sorpcia, teplota napučievania a mazovania, viskozita a zahusťovacia schopnosť, rozpustnosť škrobu, priehľadnosť a štruktúra škrobového mazu, stálosť voči pôsobeniu tepla, strižných síl a kyselín, tendencia k retrogradácii, schopnosť tvorby filmov, stabilita pri zmrazovaní/rozmrazovaní, viskozitná stálosť v soľných roztokoch, stráviteľnosť a rovnako schopnosť tvorby komplexov napríklad s anorganickými alebo organickými iónami.

2. Nepotravinársky priemysel

V tejto širokej oblasti je možné používať škrob ako pomocnú látku pri rôznych výrobných procesoch, resp. ako prísadu do technických produktov. Škrob ako pomocná látka sa používa najmä v papierenskom priemysle a v priemysle výroby lepenky. Škrob sa v tejto aplikácii používa predovšetkým na retardáciu (viazanie pevných látok), viazanie plnidiel a jemných častíc, ako stužovací prostriedok a prostriedok na odvodňovanie. Okrem toho sa využívajú výhodné vlastnosti škrobu na

dosiahnutie tuhosti, tvrdosti, akustických vlastností, požadovaného omaku, lesku, hladkosti, odolnosti proti rozštiepeniu a rovnako na dosiahnutie požadovaných vlastností povrchu..

2.1. Priemysel výroby papiera a lepenky

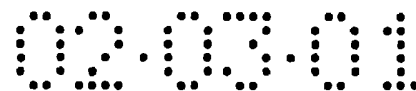
Pri výrobe papiera sa rozlišujú štyri oblasti použitia, a to úprava povrchu, natieranie, úprava papierenskej hmoty a postrek. Požiadavky na škrob pre úpravu povrchu sú najmä vysoký stupeň belosti, zodpovedajúca viskozita, vysoká viskozitná stálosť, dobrá schopnosť k tvorbe filmov a minimálna tvorba prachu. Pri použití škrobu pre nátery je dôležitý obsah pevných látok, zodpovedajúca viskozita, vysoká väzbovosť a rovnako vysoká afinita k pigmentom. Pri použití škrobu ako prísady do papierenskej hmoty sa požaduje jeho rýchle, rovnomerné a bezstratové rozptýlenie, vysoká mechanická stabilita a úplné zadržanie škrobu v prúde papieroviny. Pri použití škrobu na postrekovanie sú rovnako dôležitými vlastnosťami zodpovedajúci obsah pevných látok, vysoká viskozita a vysoká väzbovosť.

2.2. Priemysel výroby lepidiel

Priemysel výroby lepidiel predstavuje širokú oblasť použitia škrobov, ktorú je možné rozdeliť na štyri čiastkové oblasti: použitie ako čisté škrobové lepidlo, použitie do škrobových lepidiel s prísadou špeciálnych chemikálií, použitie škrobu ako prísady k syntetickým živiciam a k disperzným polymérom a nakoniec použitie škrobov ako nastavovacieho prostriedku do syntetických lepidiel. 90 % lepidiel na báze škrobu sa používa pri výrobe vlnitej lepenky, papierových sáčkov, vriec a kornútkov, na výrobu spojovacích materiálov pre papier a hliník, na výrobu kartonáže a ako zvlhčovacie lepidlo na dopisné obálky, známky a podobne.

2.3. Textilný priemysel a priemysel pomocných textilných prípravkov

Veľkým odberateľom škrobov je textilný priemysel a priemysel



textilných prípravkov, kde sa škroby používajú ako pomocný prostriedok a prísada. V rámci textilného priemyslu je možné rozlíšiť štyri oblasti použitia: použitie škrobu ako šlichtovacieho prostriedku, teda ako pomocného prostriedku na vyhladenie, spevnenie a zvýšenie súdržnosti textilných surovín na ochranu proti pôsobeniu ťahových síl pri spriadaní a tkaní a rovnako na zvýšenie odolnosti proti oderu pri tkaní, použitie škrobu ako prostriedku na zušľachtovanie textilu, najmä po úpravách zhoršujúcich kvalitu ako je bielenie, farbenie a podobne, škrob sa ďalej používa ako zahusťovací prostriedok pri výrobe farbiacich pást na potlačenie difúzie farieb a nakoniec sa škrob používa ako prísada do prostriedkov na spájanie nití.

2.4. Stavebníctvo

Štvrtou oblasťou použitia je používanie škrobu ako prísady do stavebnín. Ako príklad je možné uviesť sadrokartónové panely, kde škrob pridaný do sadrovej kaše pôsobením vody mazovatie, difunduje na povrch sadrovej dosky a viaže kartón na túto dosku. Ďalšou oblasťou použitia je pridávanie škrobu do omietok a minerálnych vlákien. Pri preprave betónu sa škrobové produkty používajú na spomalenie jeho tvrdnutia.

2.5. Stabilizácia pôdy

Ďalšou oblasťou spotreby škrobu je výroba prostriedkov na stabilizáciu pôdy, ktoré sa používajú pri pohyboch pôdy na dočasnú ochranu častíc pôdy proti vode. Kombinované produkty skladajúce sa zo škrobu a emulzií polymérov sú podľa súčasných znalostí vo svojich účinkoch na znižovanie erózie a inkrustácie porovnateľné s doteraz používanými výrobkami, sú však podstatne lacnejšie.

2.6. Použitie v prostriedkoch na ochranu rastlín a v hnojivách

V tejto oblasti sa škrob používa do prostriedkov na ochranu rastlín na zmenu ich špecifických vlastností. Škroby sa používajú na zlepšené

zmáčanie prostriedkov na ochranu rastlín a hnojív, na postupné uvoľňovanie účinných látok, na premenu kvapalných, prchavých a/alebo zapáchajúcich látok na mikrokryštalické, stabilné a tvarovateľné látky, na miešanie nekompatibilných zlúčenín a na predĺženie doby účinnosti spomalením rozkladu.

2.7. Farmaceutický, zdravotnícky a kozmetický priemysel

Ďalšou oblasťou používania škrobu je farmaceutický, zdravotnícky a kozmetický priemysel. Vo farmaceutickom priemysle sa škrob používa ako spojivo na tablety alebo na zriedňovanie spojív v kapsulách. Ďalej sa škrob používa ako prostriedok na rýchly rozpad tabliet, kde tablety po zhltnutí absorbujú tekutinu a po krátkej dobe napučievajú pričom uvoľňujú účinnú látku. Lekárske zásypy a púdre na zasypávanie rán obsahujú ako základnú látku škrob. V oblasti kozmetiky sa škroby používajú napríklad do púdrov ako nosiče prísad, ako sú vonné látky a salicylová kyselina. Pomerne značné množstvo škrobov sa používa do zubných pást.

2.8. Pridávanie škrobov do uhlia a brikiet

Škroby sa pridávajú i do uhlia a brikiet. Uhlie sa po prídavku škrobu lepšie aglomeruje resp. briketuje, čo bráni predčasnemu rozpadu brikiet. Do grilovacieho uhlia sa pridáva 4 až 6 % škrobu, do palivového uhlia 0,1 až 0,5 % škrobu. Škroby ako spojivá do uhlia nadobúdajú stále väčší význam, pretože prídavok škrobu do uhlia a brikiet môže značne znížiť emisie škodlivých látok.

2.9. Úprava rudných a uhoľných kalov

Škroby je možné používať i na úpravu rudných a uhoľných kalov ako flokulačný prostriedok.

2.10. Pomocné prostriedky v zlievarenstve

Ďalšou oblasťou je použitie škrobu ako prísady do pomocných

zlievarenských prostriedkov. Pri rôznych postupoch odlievania sú potrebné jadrá, ktoré sa vyrábajú z pieskov s prísadou spojiva. Ako spojivo sa v súčasnej dobe používa prevažne bentonit, do ktorého sa pridávajú modifikované škroby, najmä napučateľné škroby. Prídavok škrobu sa používa na zvýšenie pevnosti pri toku a na zlepšenie väzbovosti. Okrem toho môžu napučateľné škroby splňať ďalšie technické požiadavky, ako je dispergovateľnosť v studenej vode, ľahká rehydratácia, dobrá miešateľnosť s pieskom a vysoká schopnosť viazať vodu.

2.11. Použitie v gumárenskom priemysle

V gumárenskom priemysle sa môže škrob používať na zlepšenie technickej a optickej kvality výrobkov. Používa sa na zlepšenie lesku povrchu, na zlepšenie omaku a vzhľadu, pričom sa pred vulkanizáciou za studena poprášia škrobom lepidlo-pogumované plochy. Škrob sa rovnako používa i na zlepšenie potlačovateľnosti gumových výrobkov.

2.12. Výroba nahrádok kože

Ďalšou oblasťou uplatnenia modifikovaných škrobov je výroba nahrádok kože.

2.13. Škroby v syntetických polyméroch

V oblasti plastov sa škroby používajú na nasledujúce účely: prídavok škrobových produktov pri spracovaní (škrob funguje iba ako plnidlo, medzi syntetickým polymérom a škrobom nevzniká priama väzba) alebo alternatívne na viazanie škrobových produktov pri výrobe polymérov (škrob a polymér vytvárajú pevnú väzbu).

Používanie škrobu iba ako plnidla nie je v porovnaní s inými látkami, ako je napríklad mastenec, perspektívne. Situácia sa však mení, ak sa uplatnia špecifické vlastnosti škrobu a dôjde k podstatnej zmene vlastností konečného

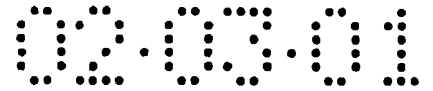


produktu. Ako príklad je možné uviesť použitie škrobových produktov pri spracovaní termoplastov, ako je polyetylén. Pritom sa škrob a syntetický polymér spracujú koexpresiou v pomere 1 : 1 na takzvaný „master batch“ (predzmes), z ktorej sa s granulovaným polyetylénom za použitia bežných technologických postupov vyrábajú rôzne produkty. Naviazanie škrobu v polyetylénových fóliách môže zvýšiť látkovú priepustnosť fóliových dutých telies, zlepšiť priepustnosť pre vodnú paru, zlepšiť antistatické vlastnosti a rovnako zlepšiť potlačovateľnosť farbami riediteľnými vodou.

Ďalšou možnosťou je použitie škrobu do polyuretánových pien. Úpravou škrobových derivátov a rovnako optimalizáciou technologických parametrov je možné cielene riadiť reakciu medzi syntetickými polymérmi a hydroxylovými skupinami škrobu. Výsledkom sú polyuretánové fólie, ktorým použitie škrobu dodáva nasledujúce vlastnosti: zníženie koeficientu tepelnej rozťažnosti, zníženie zrážanlivosti, zlepšenie vlastností pri pôsobení tlaku/ŕahu, vzrast priepustnosti pre vodnú paru bez zmeny schopnosti prijímať vodu, zníženie zápalnosti a možnosti roztrhnutia, nedochádza k odkvapkávaniu horiacich dielov, absencia halogénov a spomalené starnutie. Nevýhodami, ktoré sa v súčasnej dobe prejavujú, sú znížená pevnosť v tlaku a znížená rázová odolnosť.

Vývoj výrobkov sa však neobmedzil iba na fólie. V súčasnej dobe sa vyrábajú i masívne výrobky, ako sú napr. hrnčeky, taniere a misky, obsahujúce i viac ako 50 % škrobu. Zmesi škrobu a polymérov sú hodnotené veľmi priaznivo i z ekologického hľadiska, pretože majú podstatne vyššiu biologickú odbúrateľnosť.

Mimoriadny význam získali vrúbkované škrobové polyméry vzhľadom na ich extrémne schopnosti viazať vodu. Ide o produkty ktorých hlavný reťazec tvorí škrob a na tento reťazec sú podľa princípu radikálového mechanizmu očkované vedľajšie reťazce syntetického monoméru. Očkované škrobové polyméry, ktoré sú v súčasnej dobe k dispozícii, sa vyznačujú zlepšenou schopnosťou viazať a zadržovať vodu, a to až do množstva 1 000 g vody na 1 g škrobu pri vysokej viskozite. Oblasti použitia týchto superabsorpčných látok sa v posledných rokoch veľmi rozšírili a tieto látky sa uplatňujú v oblasti hygieny



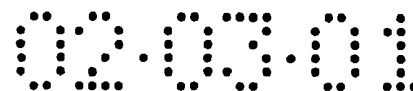
ako plienky a podložky a rovnako v poľnohospodárstve, ako napríklad na poľahovanie osiva.

Pre použitie nových géno-technicky premenených škrobov sú rozhodujúce jednak ich štruktúra, obsah vlhkosti, obsah proteínov, obsah lipidov, obsah vlákniny, obsah popola/fosfátov, pomer amyloza/amylopektín, rozloženie molárnych hmotností, stupeň rozvetvenia, veľkosť zŕn a ich tvar a kryštalinita, a jednak vlastnosti, z ktorých vyplývajú nasledujúce charakteristiky: chovanie pri toku a sorpčné vlastnosti, teplota mazovatenia, viskozita, stálosť viskozity v soľných roztokoch, zahusťovacia schopnosť, rozpustnosť, štruktúra a transparentia škrobového mazu, odolnosť voči teplu, strižným silám a kyselinám, tendencie k retrogradácii, tvorba gélov, stabilita pri zmrazovaní/rozmrazovaní, schopnosť tvoriť komplexy, viazanie jódu, tvorba filmov, pevnosť lepeného spoja, stálosť voči enzýmom, stráviteľnosť a reaktivita.

U modifikovaných škrobov, získaných z príslušných rastlín pomocou géno-technických postupov, môže dôjsť k takej zmene ich vlastností, že ďalšia modifikácia pomocou chemických alebo fyzikálnych postupov už nie je nutná. Inak je možné škroby pozmenené géno-technickými postupmi ďalej modifikovať chemickými postupmi, takže sa dosiahne ďalšie zlepšenie kvality pre vyššie uvedené účely použitia. Tieto chemické úpravy sú v zásade známe. Pri tom sa používajú najmä úpravy pôsobením tepla, pôsobením organických alebo anorganických kyselín, oxidácie a reesterifikácie, pričom vznikajú napríklad fosfáty, nitráty, sulfáty, xantáty, acetáty alebo citráty škrobu. Ďalej je možné na prípravu éterov škrobu použiť jednofunkčné alebo viacfunkčné alkoholy za prítomnosti silných kyselín, pričom vznikajú alkylétery, O-allylétery, hydroxyalkylétery, O-karboxymetyl-étery škrobu, škrobové étery obsahujúce dusík, škrobové étery obsahujúce fosfor, škrobové étery obsahujúce síru, zosieťované škroby alebo očkované škrobové polyméry.

Výhodným použitím škrobov podľa tohto vynálezu je jednak výroba obaľovaných materiálov a výrobkov na jedno použitie a jednak použite týchto škrobov ako potravín a potravinárskych polotovarov.

Na expresiu molekúl nukleových kyselín podľa tohto vynálezu v sense-



alebo antisense-orientácii v rastlinných bunkách sa tieto molekuly spoja s regulačnými DNA-prvkami, ktoré potom uskutočňujú transkripciu v rastlinných bunkách. K tomu sa ešte priradujú najmä promótor, enhancéry a terminátory. Všeobecne sa expresie môže zúčastniť ktorýkoľvek aktívny promótor v rastlinnej bunke.

Promótor je pri tom možné voliť tak, aby expresia prebiehala konštitutívne, alebo iba v určitom tkanive, v určitom časovom úseku vývoja rastliny alebo v určitom okamihu, stanovenom vonkajšími vplyvmi. Vo vzťahu k rastline môže byť tento promótor homologický alebo heterologický. Vhodnými promótorami na konštitutívnu expresiu sú napríklad promótor 35S RNA vírusu karfiolovej mozaiky a ubiquitínový promótor z kukurice, na expresiu špecifickú pre hľuzy je vhodný patatínový promótor B33 (Rocha-Sosa a spol., EMBO J. 8 (1989), 23 – 29), ako promótor zaisťujúci expresiu iba vo fotosynteticky aktívnych tkanivách je vhodný napríklad promótor ST-LS-1 (Stockhaus a spol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943 – 7947; Stockhaus a spol., EMBO J. 8 (1989), 2445 – 2451), pre endosperm-špecifickú expresiu je možné použiť HMG-promótor z pšenice, USP-promótor, faseolín-promótor alebo promótor zo zeínových génov kukurice.

Ďalej môže byť k dispozícii terminačná sekvencia, ktorá zaisťuje správne ukončenie transkripcie a zaisťuje rovnako adíciu poly-A-konca na transkript, ktorému je pripisovaná funkcia pri stabilizácii transkriptov. Tieto prvky sú v literatúre popísané (pozri napr. Gielen a spol., EMBO J. 8 (1989) a sú ľubovoľne zameniteľné.

Tento predkladaný vynález poskytuje molekuly nukleových kyselín, ktoré kódujú proteín s funkciou izoamylázy z pšenice. Molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu umožňujú prípravu tohto enzýmu, ktorý sa funkčne zúčastní biosyntézy škrobu a ktorý umožňuje získavanie génovo-technicky zmenených rastlín, v ktorých je aktivita tohto enzýmu zmenená a umožňuje tak v takto modifikovaných rastlinách uskutočňovať syntézu škrobu so zmenenou štruktúrou a so zmenenými fyzikálno - chemickými vlastnosťami.

Molekuly nukleových kyselín podľa tohto vynálezu môžu byť principiálne používané i na získavanie rastlín, v ktorých je aktivita izoamylázy podľa tohto

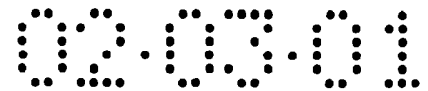


vynálezu zvýšená alebo znížená súčasne v ktorých je aktivita iných enzýmov, ktoré sa podieľajú na syntéze škrobu, zmenená. Táto zmena aktivity izoamylázy v rastlinách vedie k syntéze škrobu s pozmenenou štruktúrou. Ďalej môžu byť vnášané molekuly nukleových kyselín, ktoré kódujú izoamylázu, alebo zodpovedajúce anti-sense konštrukty do rastlinných buniek, v ktorých už bola syntéza endogénnych škrobových syntáz alebo enzýmov ovplyvňujúcich rozvetovanie reťazca inhibovaná (ako napríklad vo WO 92/14827 alebo Shannon a Garwood, 1984, v publikácii Whistler, BeMiller a Paschall, Škrob: Chemistry and Technology, Academic Press, Londýn, 2. vyd.: 25 – 86).

Ak sa má dosiahnuť v transformovaných rastlinách inhibícia viac enzýmov podieľajúcich sa na biosyntéze, je možné použiť pre transformáciu DNA-molekuly, ktoré súčasne obsahujú viac oblastí, kódujúcich zodpovedajúce enzýmy v antisense-orientácii za kontroly vhodného promótoru. Pritom môže byť alternatívne buď každá sekvencia kontrolovaná jedným vlastným promótorom, alebo môžu byť sekvencie transkribované ako fúzia jedným spoločným promótorom alebo môžu byť všetky sekvencie kontrolované jedným spoločným promótorom. Spravidla sa preferuje táto posledná alternatíva, pretože v tomto prípade je syntéza príslušných proteínov inhibovaná približne v rovnakej miere. Pre dĺžku jednotlivých kódujúcich oblastí využívanú v získanom konštrukte platí to, čo bolo už skôr uvedené pri príprave antisense-konštruktov. Horná hranica počtu antisense-transkribovaných fragmentov v promótoch jednej DNA molekuly principiálne neexistuje. Vznikajúci transkript by však nemal byť dlhší ako 10 kb, preferovane by nemal prekročiť dĺžku 5 kb.

Kódujúce oblasti, ktoré sú lokalizované v týchto DNA-molekulách v kombinácii s ostatnými kódujúcimi oblasťami v antisense-orientácii za príslušným promótorom, môžu pochádzať z DNA-sekvencií, ktoré kódujú nasledujúce proteíny: syntáza viazaná na škrobové zrno (GBSS I a II) a rozpustné syntázy (SSS I a II), enzýmy ovplyvňujúce rozvetvovanie (izoamylázy, pululanázy, R-enzýmy, „Branching“-enzýmy, „Debranching“-enzýmy), škrobové fosforylázy a disproporcionálne enzýmy. Tento výpočet je iba orientačný. V rámci týchto kombinácií je možné použiť i iné DNA-sekvencie.

Tieto konštrukty umožňujú v rastlinných bunkách, ktoré sú ich



pôsobením transformované, súčasne inhibovať syntézu niekoľkých enzýmov.

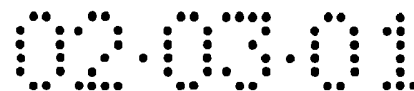
Ďalej je možné tieto konštrukty vkladať do rastlinných mutantov, ktoré sú pre jeden alebo viac génov biosyntézy škrobu defektné (Shannon a Garwood, 1984, v publikácii Whistler, BeMiller a Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, Londýn, 2. vyd. : 25 –86). Tieto defekty sa môžu týkať nasledujúcich enzýmov: syntázy viazané na škrobové zrno (GBSS I a II) a rozpustné syntázy (SSS I a II), enzýmy ovplyvňujúce rozvetvovanie (BE I a II), „Debranching“-enzýmy (R-enzýmy), disproporcionačné enzýmy a škrobové fosforylázy. Tento výpočet je iba orientačný.

Pomocou tohto postupu je ďalej možné v rastlinných bunkách transformovaných týmto spôsobom súčasne inhibovať syntézu niekoľkých enzýmov.

Na zavedenie cudzích génov do vyšších rastlín je k dispozícii veľký počet klonovacích vektorov, ktoré obsahujú replikačný signál pre *E. coli* a markérový gén pre selekciu transformovaných bakteriálnych buniek. Ako príklady týchto vektorov je možné uviesť pBR322, pUC-série, M13mp-série, pACYC184 a ďalšie.

Požadovanú sekvenciu je možné zaviesť do vektora v príslušnom reštrikčnom štiepnom mieste. Získaný plazmid sa použije na transformáciu buniek *E. coli*. Transformované bunky *E. coli* sa kultivujú vo vhodnom médiu, nakoniec sa uskutoční ich izolácia a lýza. Plazmid sa regeneruje. Ako analytické metódy na charakterizáciu získanej plazmid-DNA sa všeobecne používajú reštrikčná analýza, gélová elektroforéza a ďalšie biochemické a molekulárne-biologické metódy. Po každej manipulácii je možné plazmid-DNA rozštiepiť a získané DNA-fragmenty viazať na iné DNA-sekvencie. Každú sekvenciu plazmid-DNA je možné klonovať v rovnakom plazmide alebo v iných plazmidoch.

Na zavedenie DNA do rastlinnej hostiteľskej bunky existuje rad postupov. K týmto postupom patria transformácie rastlinných buniek s T-DNA s použitím *Agrobacterium tumefaciens* alebo *Agrobacterium rhizogenes* ako transformačným prostriedkom, fúzie protoplastov, injekcie, elektroporácie DNA, vkladanie DNA pomocou biolistickej metódy a ďalšie možnosti.

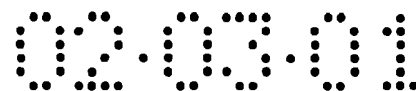


Pri injikácii a elektroporácii DNA do rastlinných buniek nie sú na použité plazmidy kladené žiadne špeciálne požiadavky. Je možné použiť jednoduché plazmidy ako napríklad pUC-deriváty. Ak sa však má z takto transformovaných buniek regenerovať celá rastlina, je spravidla nutná prítomnosť príslušného markérového génu.

V závislosti od spôsobu zavádzania požadovaných génov do rastlinnej bunky môže byť potrebné použiť ďalšiu DNA-sekvenciu. Ak sa napr. pre transformáciu rastlinnej bunky používa Ti- alebo Ri-plazmid, musí byť aspoň pravé ohraničenie, často však pravé i ľavé ohraničenie Ti- a Ri- plazmidu T-DNA spojené ako okrajová oblasť so zavádzaným génom.

Ak sa pre transformáciu používajú agrobaktérie, musí byť zavádzaná DNA klonovaná v špeciálnom plazmide, a to buď v intermediárnom vektore alebo v binárnom vektore. Intermediárne vektory je možné na základe sekvencií homologických so sekvenciami v T-DNA integrovať do Ti- alebo Ri-plazmidu agrobaktérií pomocou homologickej rekombinácie. Tento plazmid obsahuje nadto i vírusovú oblasť (vir-Region) potrebnú pre transfer T-DNA. Intermediárne vektory nie je možné replikovať v agrobaktériách. S použitím pomocného plazmidu je možné intermediárny vektor prenášať na *Agrobacterium tumefaciens* (konjugácia). Binárne vektory je možné replikovať ako v *E.coli*, tak i v agrobaktériách. Tieto vektory obsahujú selekčný markérový gén a väzbový člen (linker alebo polylinkér), ktoré rámujú sprava a zľava hraničnú oblasť T-DNA. Tieto vektory je možné transformovať priamo v agrobaktériách (Holsters a spol., *Mol. Gen. Genet.* 163 (1978), 181 – 187). Agrobaktérium ako hostiteľská bunka by mala obsahovať plazmid nesúci vírus - región. Tento vírus -región je nutný pre transfer T-DNA do rastlinnej bunky. Môžu byť prítomné i ďalšie T-DNA. Takto transformované bunky *Agrobacterium* je možné použiť na transformáciu rastlinných buniek.

Používanie T-DNA na transformáciu rastlinných buniek je predmetom intenzívneho štúdia a je dôkladne popísané v EP 120 516; Hoekema, v publikáciách *The Binary Plant Vector System*, Offsetdrukkerij Kanters B.V, Alblaserdam (1985), kapitola V; Fraley a spol., *Crit Rev. Plant. Sci.*, 4, 1 – 46 a An a spol., *EMBO J.* 4 (1985), 277 – 287.



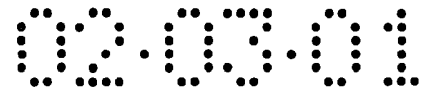
Na transfer DNA do rastlinnej bunky je možné účelne ko-kultivovať rastlinné explantáty s *Agrobacterium tumefaciens* alebo *Agrobacterium rhizogenes*. Z infikovaného rastlinného materiálu (napríklad kúsky listov, časti stoniek, korene, ale i protoplasty alebo suspenzne kultivované rastlinné bunky) je potom možné vo vhodnom médiu, obsahujúcom mimo iného určité cukry, aminokyseliny, antibiotiká alebo biocidy na selekciu transformovaných buniek, regenerovať opäť celé rastliny. V takto získaných rastlinách je potom možné sledovať prítomnosť zavedenej DNA. Sú známe i iné možnosti na zavedenie cudzej DNA s použitím biolistického postupu alebo pomocou transformácie protoplastov (pozri napr. Willmitzer, L., 1933 Transgenic plants, v publikácii *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (edit. H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler), diel 2, 627 – 659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Zatiaľ čo transformácia dikotylných rastlín prostredníctvom Ti-plazmidových vektorových systémov pomocou *Agrobacterium* je známa dostatočne, ukazujú novšie práce, že transformáciu pomocou vektorov, vychádzajúcich z *Agrobacterium* je možné uskutočňovať i v monokotylných rastlinách (Chan a spol., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 491 – 506; Hiei a spol., *Plant J.* 6 (1994), 271 – 282).

Alternatívnymi postupmi transformácie monokotylných rastlín sú použité biolistické postupy, transformácie protoplastov alebo fyzikálne alebo chemicky indukované vloženie DNA do protoplastov, napríklad pomocou elektroporácie čiastočne permeabilizovaných buniek, transfer DNA pomocou sklenených vlákien, makroinjekcie DNA do kvetenstva, mikroinjekcia DNA do mikrospór alebo pro-embryonov, vkladanie DNA pomocou klíčiaceho peľu a vkladanie DNA do embryonov napučíavaním (Prehľad: Potrykus, *Physiol. Plant* (1990), 269 – 273).

Tri z vyššie uvedených transformačných systémov boli už skôr používané na rôzne druhy obilia: elektroporácia tkaniva, transformácia protoplastov a DNA-transfer vstrelovaním častíc do regenerovateľného tkaniva a buniek (Prehľad: Jähne a spol., *Euphytica* 85 (1995), 25 – 44).

Transformácia pšenice bola popísaná v rade prác (Prehľad: Maheswari a



spol., *Critical Reviews in Plant Science* 14 (2) (1995), 149 až 178). Hess a spol. (*Plant Sci* 72 (1990), 233) použili postup makroinjekcie, aby dostali do bezprostrednej vzájomnej blízkosti peľ a agrobaktérie. Mobilizácia plazmidu obsahujúceho nptII gén ako voliteľný markér bola preukázaná pomocou Southern-Blot-analýzy a NPTII testom. Tieto transformanty vykazovali normálny fenotyp a boli fertílné. V dvoch po sebe idúcich generáciách bolo možné preukázať rezistenciu voči kanamycínu.

Prvú transgénnu fertílnu rastlinu pšenice, ktorú bolo možné regenerovať po vstrelovaní DNA viazanej na mikroprojektily popísali Vasil a spol. (*Bio/Technology* 10 (1992), 667 – 674). Cieľovým tkanivom na vstrelovanie bola embryogénna kultúra kalu (kallus typ C). Ako selekčný markér bol použitý čistý gén (bar Gen) kódujúci fosfínotrícín-acetyltransferázu a zaisťoval tak rezistenciu proti herbicidu Phosphinothricin. Ďalší systém popísali Weeks a spol. (*Plant Physiol.* 102 (1993), 1077- 1084) a Becker a spol. (*Plant J.* 5(2) (1994), 299 – 307). V tomto prípade bolo cieľovým tkanivom pre DNA-transformáciu štítok (skutellum) nezrelých embryónov, ktoré boli v počiatočnej in vitro-fáze stimulované k indukcii somatických embryónov. Účinnosti tejto transformácie bola v systéme, ktorý vyvinuli Becker a spol. (citácia pozri skôr), s 1 transgénnou rastlinou na 83 embryónov druhu „Florida“ podstatne vyššia ako pri systéme ktorý vypracovali Weeks a spol. s 1 až 2 transgénnymi rastlinami na 1 000 embryónov druhu „Bohwhite“.

Systém ktorý vyvinuli Becker a spol. (citácia pozri skôr) tvorí základ transformačných pokusov popísaných v príkladoch uskutočnenia.

Akonáhle sa vložená DNA integruje do genómu, zostáva v ňom spravidla stabilne a zostáva zachovaná i v potomstve pôvodných transformovaných buniek. Obsahuje spravidla jeden z vyššieuvedených selekčných markérov ktorý zaisťuje transformovaným rastlinným bunkám napríklad odolnosť proti biocidným prostriedkom ako je Phosphinothricin alebo proti antibiotikám ako je kanamycín, G418, Bleomycín alebo Hygromycín alebo umožňuje uskutočňovať selekciu za prítomnosti alebo neprítomnosti určitých cukrov alebo aminokyselín. Individuálne zvolený markér by mal preto umožňovať selekciu transformovaných buniek za bunky, ktorým vložená DNA chýba.

Transformované bunky rastú v rastline normálnym spôsobom (pozri napr. McCormick a spol., Plant Cell Reports 5 (1986), 81 – 84). Výsledné rastliny je možné normálne pestovať a je možné ich krížiť s rastlinami, ktoré majú rovnaké alebo odlišné dedičné vlastnosti. Takto vzniknuté hybridné individua majú zodpovedajúce fenotypové vlastnosti. Z rastlinných buniek je možné získať semená. Aby bolo zaistené, že fenotypová vlastnosť zostala zachovaná a že je dedičná, je potrebné uskutočniť pestovanie dvoch alebo niekoľkých generácií. Je potrebné zozbierať i semená, aby bolo zaistené, že zostal zachovaný príslušný fenotyp alebo ostatné charakteristické vlastnosti.

Nasledujúce príklady ilustrujú tento vynález, v žiadnom prípade ich však neobmedzujú.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Postup klonovania

Pre klonovanie v E.coli bol použitý vektor pBluescript II SK (Stratagene).

Príklad 2

Kmene baktérii

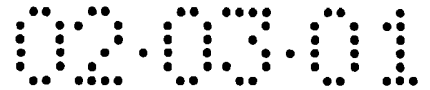
Pre vektor Bluescript a pre antisense-konštrukty bol použitý E.coli kmeň DH5 α (Bethesda Laboratories, Gaithersburg, USA). Pre excíziu uskutočnenú in vivo bol použitý E.coli kmeň LX1-Blue.

Príklad 3

Transformácia nezrelých pšeničných embryónov

Médiá:

MS:	100 ml/makrosoľ	(D.Becker a H.Lörz,
	1 ml/1 mikrosoľ	Plant Tissue Culture
	2 ml/1 Fe/NaEDTA	Manual (1996), B 12 : 1 – 20)
	30 g/1 sacharóza	
# 30:	MS + 2,4-D (2 mg/1)	
# 31:	MS + 2,4-D (2 mg/1) + Phosphinothricín (PPT, aktívny komponent	



herbicídu BASTA (2 mg/1)

32: MS + 2,4-D (0,1 mg/1) + PPT (2 mg/1)

39: MS + 2,4-D (2 mg/1) + po 0,5 N mannit/sorbit

V uvedených médiách bola hodnota pH nastavená pomocou KOH na 5,6 a média boli stužené 0,3 % prípravku Gelrite.

Metódu transformácie nezrelých embryónov z pšenice vyvinuli a optimalizovali Becker a Lörz (D. Becker a H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual (1996), B 12 : 1 až 20).

V ďalej popísaných pokusoch bol dodržovaný protokol, ktorý vypracovali Becker a Lörz (citácia pozri skôr).

Pre transformáciu boli klasy s karyopsami v stupni vývoja 12 až 14 dní po antézii zberané a povrchovo sterilizované. Izolovaná skutela bola nanesená s osou ebyra, priradenou k médiu na indukčné médium # 30.

Po dvoj- až štvordennej predbežnej kultivácii (26 °C, tma) boli explantáty prevedené na médium # 39 pre osmotickú predbežnú kultiváciu (osmotische Vorkultur) (2 až 4 hodiny, 26 °C, tma).

Na biolistickú transformáciu bolo pre jedno vstrelovanie použité cca 29 µg častíc zlata, na ktoré bolo predtým vyzrážané niekoľko µg cieľovej DNA. Vzhľadom na to, že pri uskutočňovaných pokusoch išlo o ko-transformanty, bola cieľová DNA na zrážanie pridávaná s cieľovým génom a rezistentným markérovým génom (bar-Gén) v pomere 1 : 1.

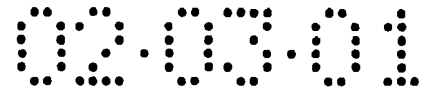
Príklad 4

DIG-značenie DNA-fragmentov

Značenie DNA- fragmentov použitých ako screeningové sondy bolo uskutočnené pomocou špecifickej PCR s vkladáním DIG-značeného dUTP (Boehringer Mannheim, Nemecko).

Média a roztoky použité v príkladoch uskutočnenia :

20 x SSC	175,3 g NaCl
	88,2 g natriumcitrát
	doplniť do 1 000 ml redest. vodou
	úprava na pH 7,0 roztokom 10 N NaOH



V DSMZ v Braunschweigu, SRN, bolo uskutočnené uloženie plazmidu pTaSU 8A podľa Budapeštskej zmluvy pod číslom DSM 12795 a rovnako plazmidu pTaSU 19 pod č. DSM 12796.

Príklad A

Identifikácia, izolácia a charakterizácia cDNA, kódujúcej izoamylázu (sacharidický homológ /sugary H./) z pšenice (*Triticum aestivum* L., odroda Florida)

Na identifikáciu úplnej cDNA, kódujúcej izoformu izoamylázy (sacharidická – sugary) z pšenice bola použitá stratégia heterologického screeningu. Pritom bola preskúmaná cDNA- banka z pšenice pomocou sacharidickej sondy z kukurice.

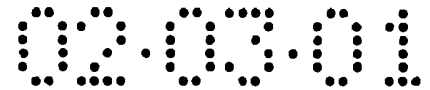
Izolácia tejto sacharidickej sondy z kukuričnej cDNA banky bola uskutočnená pomocou špecifického priméru PCR-amplifikáciou. Klonovanie kukuričnej cDNA banky bolo uskutočnené z poly (A) + RNA zo zmesi rovnakých podielov 13, 17, 19, 20, 22, 25 a 28 dní (DAP) starých karyopsov vo vektore Lambda Zap II podľa údajov výrobcu (Sada /kit/ na syntézu Lambda ZAP II-cDNA, Stratagene GmbH, Heidelberg, Nemecko). Vo všetkých použitých karyopsoch, s výnimkou zrn starých 13 dní, bolo pred izoláciou RNA odstránené embryo.

Amplifikácia DNA-fragmentu použitého ako sonda na skúmanie pšeničnej cDNA-banky bolo uskutočnené s nasledujúcimi primérami :

su1p-1a: 5'AAAGGCCCAATATTATCCTTTAGG 3'(Seq.ID No.4)

su1p-2 : 5'GCCATTTCAACCGTTCTGAAGTCGGGAAGTC 3' (Seq. ID No.5)

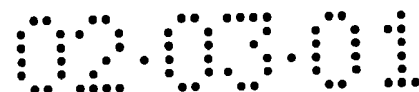
Ako templáty pre PCR-reakciu boli použité 2 μ l amplifikovanej kukuričnej cDNA-banky. Táto PCR-reakčná zmes obsahovala ďalej 1,5-3 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 0,8 mM dNTP Mix, 1 μ M primér su1p-1a, 1 μ M primér su1p-2 a 2,5 jedn. Taq polymerázy (rekombinantná, Life Technologies). Amplifikácia bola uskutočnená v zariadení Trioblock od firmy Biometra podľa schémy : 4'(min)/95 °C; 1'/95 °C; 45'' (sek.)/58 °C; 1'15'' /72 °C; 30 cyklov 5'/72 °C. Amplifikované DNA-pásky s veľkosťou cca 990 bp boli rozdelené v agarózovom géli a vyrezané. S týmto fragmentom bola podľa



vyššie uvedenej schémy uskutočnená druhá amplifikácia. Fragment s veľkosťou 990 bp získaný z tejto druhej amplifikácie bol rozštiepený pomocou reštrikčného enzýmu *BAM* HI na fragment s veľkosťou 220 bp a fragment s veľkosťou 770 bp. Po opakovanom delení sacharidického (sugary) fragmentu na agarózovom géli, vyrezaní pásu a izolácii tohto fragmentu bolo uskutočnené DIG-značkovanie sondy. Na značkovanie „random prime“ pomocou digoxygenínu bolo použité 500 ng sacharidického fragmentu. K tomuto značkovaniu fragmentu bolo pridané 10 μ l prípravku Random Primer a reakčná zmes bola zahrievaná po dobu 5' na teplotu 95 – 100 °C. Po zahrievaní boli pridané 0,1 mM dATP, 0,1 mM dGTP, 0,1 mM dCPT a 0,065 mM dTTP a 0,035 mM Digoxigenín-11-dUTP (Boehringer Mannheim) a pufor Klenow (štandard) a 1 jednotka polymerázy Klenow. Reakcia bola uskutočňovaná pri RT (laboratórnej teplote) cez noc. Na kontrolu značkovania bol použitý Dot-test (bodkovací test) podľa údajov výrobcu (príručka „Dig System User's Guide for Filter Hybridization“ od firmy Boehringer, Mannheim, Nemecko).

Syntéza pšeničnej cDNA-banky bola uskutočnená z poly(A)+RNA z 21 dní starých karyopsov („starchy“ -endosperm) vo vektore Lambda ZAP II Vektor podľa údajov výrobcu (Sada /kit/ na syntézu Lambda ZAP II-cDNA, Stratagene GmbH, Heidelberg, Nemecko). Po stanovení titra cDNA-banky bola stanovená hodnota primárneho titra $1,26 \times 10^6$ pfu/ml.

Na preskúmanie pšeničnej cDNA-banky bolo nanosené na dosku cca 350 000 fágov. Nanášanie fágov a vyhodnocovanie dosiek bolo uskutočnené podľa štandardného protokolu. Prehybridizácia a hybridizácia filtra bola uskutočnená v 5X SSC, 3 % Blocking (Boehringer, Mannheim), 0,2 % SDS, 0,1 % natriumlaurylsarkozín a 50 μ g/ml DNA sledích spermii pri 55 °C. Do hybridizačného roztoku bol pridaný 1 ng/ml značkovanej sacharidickej sondy a hybridizácia bola inkubovaná cez noc. Filtry boli premyté 2X5' v 2XSSC, 1% SDS pri laboratórnej teplote; 2X10' v 1XSSC, 0,5 % SDS pri 55 °C; 2X10' v 0,5XSSC, 0,2 % SDS pri 55 °C. Pozitívne klony boli spojené pri ďalších screeningových postupoch. Excíziou *in vivo* boli získané spojené klony ako pBluescript SK Phagemide (uskutočnené podľa údajov výrobcu; Stratagene,



Heidelberg, Nemecko).

Po analýze tohto klonu pomocou minipreparácie a reštrikcie získanej plazmid-DNA bol klon pTaSU-19 uložený v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH pod číslom DSM 12796 a bol ďalej analyzovaný.

Príklad B

Sekvenčná analýza cDNA-inzerciou plazmidu pTaSU-19

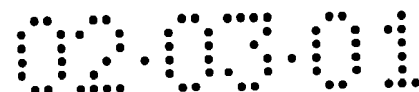
Z klonu pTaSU-19 bola izolovaná plazmid-DNA a sekvencia cDNA-inzertov bola stanovená didezoxynukleotidovou metódou (Sanger a spol., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 (1997), 5463 – 5467).

Inzercia klonu pTaSU-19 má dĺžku 2997 bp a predstavuje čiastočnú cDNA. Nukleotidová sekvencia je uvedená pod označením Seq ID No.1. Z porovnania s už publikovanými sekvenciami vyplynulo, že sekvencia uvedená pod označením SeqID No.1 zahŕňa úplnú kódujúcu oblasť, ktorá vykazuje homológiu s izoamylázami z iných organizmov. Analýza tejto sekvencie rovnako preukázala, že cDNA-sekvencia obsahuje dva intróny v pozícií 297-396 (intrón 1) a 1618-2144 (intrón 2). Po odstránení týchto intrónov je možné odvodiť proteínovú sekvenciu, ktorá vykazuje homológiu s proteínovými sekvenciami izoamyláz z iných organizmov. Aminokyselinová sekvencia zodpovedajúca kódujúcim oblastiam Seq ID No.1 je vedená pod označením Seq ID No.3.

Príklad C

Príprava rastlinného transformačného vektora pTa-alfa-SU19

Na expresiu antisense-RNA zodpovedajúcej TaSU19-cDNA bol na základe základného plazmidu pUC19 konštruovaný rastlinný transformačný vektor pTA-alfa-SU19, v ktorom bola spojená cDNA-inzercia plazmidu pTa-alfa-SU19 v antisense-orientácii s 3'-koncom ubiquitinového promótoru. Tento promótor sa skladá z prvého neprenosového exónu (untranslatierter Exon) a prvého intrónu *ubiquitin 1*-génu z kukurice (Christensen A. H. a spol., Plant Molecular Biology 18 (1992), 675 – 689). Časti polylinkéru a NOS-terminátor pochádzajú z plazmidu pACT1.cas (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box



3200, Canberra ACT 2601, Austrália). Vektorové konštrukty s týmto terminátorom a konštrukty založené na pACT1.cas sú popísané v práci McElroy a spol. (Molecular Breeding 1 (1995), 27- 37). Takto vzniknutý vektor bol pomenovaný PUb.cas.

Klonovanie tohto vektora bolo uskutočňované reštrikciou 2 kb fragmentu z klonu Ta-SU19 pomocou reštrikčného enzýmu *Xba* I. Tento fragment bol na koncoch doplnený pomocou Klenowovej reakcie a potom bol naviazaný na klonovacie miesto *Sma* I expresného vektora pUbi.cas.

Vzniknutý expresný vektor bol označený Ta-alfa-SU19 a bol vyššieuvedeným postupom použitý na transformáciu pšenice.

Príklad D

Izolácia a charakterizácia ďalšej cDNA kódujúcej izoamylázu (Sugaryl-homolog) z pšenice (*Triticum aestivum* L., odroda Florida).

cDNA-banka z pšenice bola preskúvaná sondou Sugary-Sonde, ktorá predstavovala časť klonu pTaSU19, a to pozíciu 489-1041 zo Seq.ID No.1.

Príprava digoxigenínom značkovej Sugary-Sonde špecifickej pre pšenicu, použitej na preskúvanie cDNA-banky, bola uskutočnená pomocou PCR-amplifikácie. Priméry použité pri tejto reakcii boli nasledujúce :

SUSO1: 5'-GCT TTA CGG GTA CAG GTT CG-3'(Aseq.ID No.8), a

SUSO2: 5'-AAT TCC CCG TTT GTG AGC-3'(Seq.ID No.9).

Ako templát bol do reakcie použitý 1 ng plazmidu pTaSU19. Reakčná zmes pre PCR obsahovala okrem toho 300 nM priméru SUSO1 a SUSO2, po 100 μ M nukleotidu dATP, dGTP, dCTP, 65 μ M dTTP, 35 μ M preparátu Digoxigenín-11-dUTP (Boehringer Mannheim), 1,5 mM MgCl₂ a 2,5 U (jedn.) preparátu Taq Polymerázy a 10 μ l desaťnásobne koncentrovaného reakčného pufru Taq Polymerázy (oba preparáty od Life Technologies). Konečný objem reakčnej zmesi bol 100 μ l. Amplifikácia bola uskutočnená v prístroji PCR-Gerät (TRIO[®] Thermoblock, Biometra) pri nasledujúcom teplotnom programe: 3'(min) pri 95 °C (raz); 45'' (sec.) pri 95 °C - 45'' pri 55 °C – 2' pri 72 °C (30 cyklov); 5' pri 72 °C (raz). Vzniknutý DNA-fragment mal dĺžku 553 bp. Vloženie Digoxigenín-11-dUTP do PCR-produktu bolo preukázané podľa nepatrnej



mobility v agarózovom géli v porovnaní s produktom kontrolnej reakcie bez Digoxygenín-11-dUTP.

Karoypticko-špecifická cDNA-banka z pšenice z Príkladu 1 bola preskúmaná pomocou získanej sondy značenej digoxygenínom.

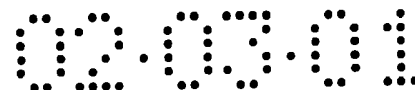
Postup hybridizácie bol uskutočnený cez noc v 5X SSC, 0,2 % SDS, 0,1 % nátriumlaurylsarkozín a 50 µg/ml DNA sledíich spermii (Heringssperma) pri teplote 68 °C za prídavku 1 ng/ml digoxygenínom značenej sondy. Po hybridizácii boli filtre premyté 2X5' v 2XSSC, 1% SDS pri laboratórnej teplote; 2X10' v 1XSSC, 0,5 % SDS pri 68 °C; 2X10' v 0,5XSSC, 0,2% SDS pri 68 °C. Pozitívne klony boli získané minimálne dvoma ďalšími screeningovými postupmi. Excíziou *in vivo* boli z fágových klonov získané pBluescript SK plazmidy (protokoly podľa údajov výrobcu; Stratagene, Heidelberg, Nemecko). Po reštrikčnej analýze bol získaný klon pTaSU8A uložený v Nemeckej zbierke mikroorganizmov a bunkových kultúr DSMZ – Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH pod číslom DSM 12795 a bol ďalej analyzovaný.

Príklad E

Sekvenčná analýza cDNA-insertu v plazmide pTaSU8A

Nukleotidová sekvencia cDNA-insertu v plazmide pTaSU8A bola stanovená pomocou didezoxynukleotidovej metódy (Seq. ID No.6).

Táto inzercia klonu pTaSU8A má dĺžku 2437 bp a predstavuje parciálnu cDNA. Pri porovnaní s doteraz publikovanými sekvenciami sa ukázalo, že sekvencia označená ako Seq. ID No.6 zahŕňa kódujúcu oblasť vykazujúcu homológiu s izoamylázami z iných organizmov. Rovnako tak proteínová sekvencia, odvodená z kódujúcej oblasti klonu pTaSU8A, znázornená ako Seq. ID No.7, vykazovala homológiu s proteínovými sekvenciami izoamyláz z iných organizmov. Z porovnania sekvencií klonu pTaSU19 (Seq.ID No.1) a pTaSU8A (Seq. ID No.6) vyplýva 96,8 %-ná podobnosť. Väčšina rozdielov medzi oboma sekvenciami spočíva v 3'-neprenosovej oblasti cDNA. Ostatné rozdiely v sekvenciách v kódujúcej oblasti spôsobujú rôzne aminokyseliny celkom v dvanástich pozíciách odvodených proteínových sekvencií (Seq. ID No.3 a 7).



cDNA obsiahnuté v pTaSU19 a pTaSU8A nie sú identické a kódujú izoformy izoamyláz z pšenice.

Príklad F

Príprava rastlinného transformačného vektora pTa-alfa-SU8A

Na expresiu antisense-RNA zodpovedajúcej TaSU8A-cDNA bol na základe základného plazmidu pUC19 konštruovaný rastlinný transformačný vektor pTa-alfa-SU8A, v ktorom bola spojená časť TaSU8A-cDNA v antisense-orientácii s 3'-koncom ubiquitínového promótoru. Tento promótor sa skladá z prvého neprenosového exónu a prvého intronu *ubiquitin 1* génu z kukurice (Christensen A. H. a spol., *Plant Molecular Biology* 18 (1992), 675 – 689). Časti polylinkéru a NOS-terminátor pochádzajú z plazmidu pACT1.cas (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Austrália). Vektorové konštrukty s týmto terminátorom a konštruktami založené na pACT1.cas sú popísané v práci McElroy a spol. (*Molecular Breeding* 1 (1995), 27 – 37). Vektor s ubiquitínovým promótorom, polylinkérom a NOS-terminátorom na základe pUC19 bol pomenovaný pUbi.cas.

Na klonovanie pTa-alfa-SU8A bola pomocou PCR amplifikovaná časť TaSU8A-cDNA s veľkosťou cca 2,2 kb, a to pozícia 140 – 2304 zo Seq. ID No.6.

Priméry použité pri tejto reakcii boli nasledujúce :

SUEX3:

5'- GCG GTA CCT CTA GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCG GAG GAC AGG TAC GCG CTC-3'(Seq.ID No.10), a

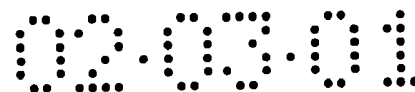
SUEX4:

5'-GCT CGA GTC GAC TCA AAC ATC AGG GCG CAA TAC-3'(Seq.Id No.11).

Ako templát bol do reakcie použitý 1 ng plazmidu pTaSU8A. PCR-reakčná zmes okrem toho obsahovala: po 300 nM priméru SUEX3 a SUEX4, po 200 μ M nukleotidu dATP, dGTP, dCTP a dTTP, 1,6 mM MgCl₂, 60 mM Tris-SO₄ (pH 9,1), 18 mM (NH₄)₂SO₄ a rovnako 1 μ l preparátu Elongase[®] Enzym Mix (zmes Taq Polymerase a DNA Polymerase, Life Technologies). Konečný objem reakčnej zmesi bol 50 μ l. Amplifikácia bola uskutočnená v prístroji PCR-

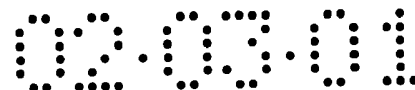
Gerät (TRIO® Thermoblock, Biometra) pri nasledujúcom teplotnom programe :
1'(min) pri 94 °C (raz); 30'' (sec.) pri 95 °C – 30 '' pri 55 °C – 2'30'' pri 68 °C
(30 cyklov); 10' pri 68 °C (raz). Pri tejto reakcii vznikol DNA-fragment s dĺžkou
2205 bp.;

Tento 2,2 kb-produkt bol reštringovaný pomocou *KpnI* a *SalI* a bol
naviazaný do expresného vektora pUbi.cas upraveného pomocou *KpnI* a *SalI*.
Takto vzniknutý rastlinný transformačný vektor bol označený ako pTa-alfa-
SU8A a bol použitý na transformáciu pšenice podľa vyššie uvedeného postupu.



PATENTOVÉ NÁROKY

1. Molekula nukleových kyselín kódujúca proteín s funkciou izoamylázy z pšenice, vybraná zo skupiny ktorú tvoria
 - (a) molekula nukleovej kyseliny kódujúca proteín, ktorá zahŕňa sekvenciu aminokyselín uvedenú pod Seq ID NO.3 alebo Seq ID NO.7
 - (b) molekula nukleovej kyseliny, zahŕňajúca nukleotidovú sekvenciu uvedenú pod Seq ID No. 6 alebo jej časť alebo tomu zodpovedajúcu ribonukleotidovú sekvenciu,
 - (c) molekula nukleovej kyseliny, hybridizovaná s niektorou z molekúl nukleovej kyseliny uvedenej pod (a) alebo (b) alebo je s ňou komplementárna, a
 - (d) molekula nukleovej kyseliny, ktorej nukleotidová sekvencia je na základe degenerácie genetického kódu odlišná od sekvencie molekúl nukleovej kyseliny uvedenej pod (a), (b) alebo (c).
2. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že ide o molekulu DNA.
3. DNA-molekula podľa nároku 2, **vyznačujúca sa tým**, že ide o molekulu cDNA.
4. Molekula nukleovej kyseliny podľa jedného alebo viac z nárokov 1 až 3, ktorá obsahuje regulačné prvky.
5. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že ide o molekulu RNA.
6. Molekula nukleovej kyseliny, ktorá je špecificky hybridizovaná



s molekulou nukleovej kyseliny podľa niektorého z nárokov 1 až 5.

7. Molekula nukleovej kyseliny podľa nároku 6, ktorá je oligonukleotidom s dĺžkou minimálne 15 nukleotidov.

8. Vektor, obsahujúci DNA-molekulu podľa niektorého z nárokov 1 až 5.

9. Vektor podľa nároku 8, v ktorom je uvedená molekula nukleovej kyseliny spojená s regulačnými prvkami v sense-orientácii, ktorá zaisťuje transkripciu a syntézu prenosovej RNA do pro- alebo eukaryotických buniek.

10. Vektor podľa nároku 8, v ktorom je uvedená molekula nukleovej kyseliny spojená s regulačnými prvkami v sense-orientácii, ktorá zaisťuje transkripciu a syntézu neprenosovej RNA do pro- alebo eukaryotických buniek.

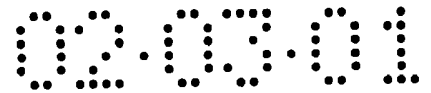
11. Vektor podľa nároku 8, v ktorom je uvedená molekula nukleovej kyseliny spojená s regulačnými prvkami v antisense-orientácii, ktorá zaisťuje transkripciu a syntézu neprenosovej RNA do pro- alebo eukaryotických buniek.

12. Hostiteľská bunka, ktorá je transformovaná molekulou nukleovej kyseliny podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 1 až 5 alebo vektorom podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 8 až 11, alebo bunka z takejto bunky pochádzajúca.

13. Proteín, kódovaný molekulou nukleovej kyseliny podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 1 až 4.

14. Spôsob prípravy proteínu podľa nároku 13, pri ktorom sa hostiteľská bunka podľa nároku 12 kultivuje za podmienok, umožňujúcich syntézu uvedeného proteínu a tento uvedený proteín sa z kultivovaných buniek a/alebo z kultivačného média izoluje.

15. Spôsob prípravy transgéennej rastlinnej bunky, pri ktorom sa a) molekula nukleovej kyseliny podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 1 až 5



alebo

b) vektor podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 8 až 11 integruje do genómu rastlinnej bunky.

16. Transgénná rastlinná bunka, transformovaná molekulou nukleovej kyseliny podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 1 až 5 alebo vektorom podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 8 až 11, alebo bunka z takejto bunky pochádzajúca.

17. Spôsob výroby transgénnnej rastlinnej bunky, pri ktorom sa
a1) molekula nukleovej kyseliny podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 1 až 5 alebo
a2) vektor podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 8 až 11 integruje do genómu rastlinnej bunky a
b) z uvedenej rastlinnej bunky sa regeneruje celá rastlina.

18. Rastlina, obsahujúca rastlinnú bunku podľa nároku 16.

19. Rastlina podľa nároku 19, ktorá je monokotýlnou alebo dikotýlnou rastlinou.

20. Rastlina podľa nároku 19, ktorá je úžitkovou rastlinou.

21. Rastlina podľa nároku 20, ktorá je rastlinou ukladajúcou škrob.

22. Rastlina podľa nároku 21, ktorou je rastlina kukurice, ryže, zemiakov alebo pšenice.

23. Množiteľský materiál rastliny podľa jedného alebo niekoľkých nárokov 18 až 22.

24. Škrob, získateľný z rastlinnej bunky podľa nároku 16, z rastliny podľa

jedného alebo viac nárokov 18 až 22 alebo z množiteľského materiálu podľa nároku 23.

25. Použitie škrobu podľa nároku 24 na výrobu potravín alebo potravinárskych polotovarov, výhodne pečiva alebo cestovín.

26. Použitie škrobu podľa nároku 24 na výrobu obalových materiálov alebo výrobkov na jedno použitie.