

K I V O N A T

Új szignálszekvenciák

Ciba-Geigy AG., Basel, Svájc

A bejelentés napja: 1991. 06. 14.

Elsőbbsége: 1990. 06. 15. (2007/90-9) Svájc

A találmány új peptid-fragmentumokra ("targeting"-szignálokra) vonatkozik, amelyeket növényi vakuóla proteinek C-terminális szakaszából (C-terminális extenzió) állíthatunk elő és amelyek egy tetszőleges protein molekulával funkcionális kapcsolatban, az ezzel a peptid fragmentummal asszociált proteineknek a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáról gondoskodnak. Ugyancsak a találmány tárgyát képezik a szóbanforgó peptid fragmentumokat kódoló DNS molekulák is.

A találmány további tárgyát képezik azok a rekombináns DNS molekulák, amelyek a találmány szerinti DNS szekvenciát egy kifejezhető DNS-sel funkcionális kapcsolatban tartalmazzák, valamint az innen levezethető vektorok. Hasonlóan a találmányhoz tartoznak a gazda-sejtek és/vagy a gazda-szervezetek, valamint az olyan transzgenikus növények, amelyek a szóbanforgó rekombináns DNS-t és az innen levezethető vektorokat tartalmazzák.

SB.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

1994/91
58758

54.369/PA

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

1 A"
N605 : C07K 1/14
C12N 15/29
C12N 15/84

Új szignálszekvenciák

Ciba-Geigy AG., Basel, Svájc

Feltalálók: prof.dr. Thomas BOLLER, Oberwill,

dr. Jean-March NAUHAUS, Basel, Svájc

dr. John RYALS, Durham, Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1991. 06. 14.

Elsőbbsége: 1990. 06. 15. (2007/90-9) Svájc

A találmány olyan új peptid fragmentumokra ("targeting"-szignál) vonatkozik, amelyeket növényi vakuóla-proteinek C-terminális szakaszából (C-terminal extension) állíthatunk elő és amelyek egy tetszés szerinti protein molekulával funkcionálisan összekapcsolva, az ezen peptid fragmentumokkal asszociált említett proteinnek a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáról gondoskodnak.

Foglalkozik a találmány továbbá olyan DNS szekvenciákkal, ezek mutánsaival és variánsaival, amelyek az előbbieken bővebben ismertetett peptid fragmentumokat kódolják és amelyek funkcionálisan kapcsolódva egy tetszés szerinti, kifejezhető DNS-sel, olyan génterméket eredményeznek, amely célzottan a növényi vakuólába jut be.

A találmány további tárgyát képezik azok a rekombináns DNS molekulák, amelyek a találmány szerinti DNS szekvenciát egy kifejezhető DNS-sel funkcionális kapcsolatban tartalmazzák és az ezen molekulákat tartalmazó vektorok. A találmány magába foglalja azokat a gazdasejteket és/vagy gazda-szervezeteket és átvitt gént tartalmazó (transzgenikus) növényeket is, amelyek az említett rekombináns DNS-t, illetve az ennek megfelelő vektorokat tartalmazzák.

A találmány szerinti DNS szekvenciák, valamint az ezen DNS szekvenciákat tartalmazó DNS molekulák és vektorok előállítását szolgáló eljárások éppen úgy a találmány tárgyát képezik, mint felhasználásuk a transzgenikus növények előállítására.

A géntechnológia területén az utóbbi időben növekszik annak igénye, hogy a beültetett idegen gén tiszta expresszióján keresztül olyan DNS szekvenciákat kutassanak fel, amelyek ugynevezett szignál szekvenciákat kódolnak. Az ilyen szignál szekvenciák teszik lehetővé, hogy az asszociált géntermék funkciójának megfelelően specifikus rendeltetési helyéhez jusson, ahol optimális hatását kifejtheti vagy pedig alkalmas módon elraktározódhat. Az egész növényre vonatkozóan ez azt jelenti, hogy például olyan promotereket kísérelnek meg azonosítani, vagy kifejleszteni, amelyek lehetővé teszik a bejuttatott idegen gén szövetre és/vagy fejlődésre specifikus kifejeződést.

A bejuttatott idegen gén cél-, illetve rendeltetés-orientált elhelyezkedése nemcsak a növény szintjén lényeges, hanem más a sejtek szintjén is nagy jelentőségű, különösen ami a transzformáció hatékonyságát illeti.

Például ismeretes, hogy úgy a növényi, mint más eukarióta sejtekben a proteinek többsége bár a citoplazmatikus riboszómákon szintetizálódik, ugyanakkor azonban e proteinek nagy részére egészen különböző szubcelluláris kompartmentumokban van szükség. Pusztán néhány mitokondriális és kloroplaszt protein képez kivételt, amelyek közvetlenül a felhasználás helyén képződnek. A citoplazmában előállított proteinek ezzel szemben vagy a sejten át huzódó endomembrán rendszer mentén szállítottnak a litikus kompartmentumba (vakuólák, lizoszómák) és az extracelluláris térbe, vagy pedig közvetlenül felveszi őket saját mindenkori kompartmentumok (vakuólák, kloroplasztok, peroxiszómák).

A szubcelluláris szinten megvalósult kompartmentalizációs rend fenntartásához a sejten belül specifikus transzport és osztályozó rendszereknek kell lenniük, amelyek a citoplazmatikusan termelt proteinek rendeltetésének megfelelő szétosztásáról gondoskodnak. Ennélfogva ezeknek a proteineknek egy vagy inkább több pótlólagos információt kell tartalmazniuk, amelyek lehetővé teszik, hogy a sejt említett transzport- és osztályozó rendszerei szubsztrátumokat felismerjék, s ezt specifikus rendeltetési helyére irányítsák. Így például számos mitokondriális és kloroplaszt protein citoplazmatikus prekursora N-terminális végén egy úgynevezett tranzit-peptidet mutattak ki, amely ezeknek a proteineknek a nekik megfelelő kompartmentumba való felvételét biztosítja. Ennek teljesen megfelelően a nukleáris proteinek egy sejtmag-specifikus szekvenciát tartalmaznak.

Az intercelluláris protein transzport szempontjából különleges jelentősége van a sejt endomembrán rendszerének. A sejten áthuzódó ezen membrán rendszer, amelyet az endoplazmatikus retikulum és a Golgi-készülék alkot, lényegében a proteineknek, főként a citoplazmatikusan előállított proteineknek a litikus kompartmentumba (vakuólák, lizoszómák) és az extracelluláris térbe való transzportjára szolgál.

Az endomembrán rendszer által szállított proteinek először az endoplazmatikus retikulumba kerülnek. Az ehhez a lépéshez szükséges transzport-szignált a molekula N-terminális végén lévő egy szignál-szekvencia, az ún. szignál-peptid képviseli. Ez a szignál-peptid, mielőtt feladatát teljesítette, a prekursor proteinről proteolitikus úton lehasad. Specifikus funkciójának megfelelően e szignál-peptid szekvencia típus az evolúció folyamán minden élő sejtnél nagymértékben állandó maradt, függetlenül attól, hogy baktériumról, élesztőről, gombáról, állatról vagy növényről van szó.

Egy további osztályozó lépés a Golgi-készülékben történik, ahol elválnak a litikus kompartmentumba (vakuólák, lizoszómák) szánt és az extracelluláris térbe történő szekrécióhoz szánt proteinek.

Élesztőknél és állatoknál végzett vizsgálatokban azt találták, hogy azok a proteinek, amelyek nem tartalmaznak pótlólagos szignált, nyilvánvalóan automatikusan választódnak ki az extracelluláris térbe, míg azok a proteinek, amelyek egy ilyen pótlólagos osztályozó szignált tartalmaznak, a litikus kompartmentumba jutnak be.

Az osztályozó szignálok tulajdonságai egészen különbözőek lehetnek. Az eddig vizsgált állatoknál például a glükoproteinek glükán láncán belül rendszerint egy specifikus módosulat fordul elő, s ez egy mannóz-6-foszfát csoport. Ezt a csoportot egy specifikus mannóz-6-foszfát receptor ismeri fel, melynek következtében a megfelelő proteinek - speciális vezikulákban - a Golgi-készülékből felszabadulnak és a lizoszómákhoz szállítódnak. Eddig azonban még nem sikerült azt a polipeptid szekvenciát kideríteni, amely a glükán oldalláncon lévő egy mannóz csoport foszforilálását megindítaná.

Élesztőben a litikus kompartmentumok számára megfelelő osztályozó szignál nem glükán lánc, hanem egy aminosav szekvencia, ami a szignál-peptid lehasadása után a protein N-terminálisát alkotja. A vakuólának megfelelő ezen N-terminális "targeting"-szignált általában magában a vakuólában a proteináz A hasítja le. Gyakran fordul elő, hogy a vakuólába transzportált protein csak a "targeting"-szignál lehasadása után válik katalitikusan aktív enzimmé. Növényeknél a proteinek vakuólába való bejutásáért felelős "targeting"-szignál problémája azért különösen érdekes - főként az alkalmazást illető szempontok miatt - mivel a vakuóla a növényi sejtnél nemcsak litikus kompartmentumot jelent, hanem a legnagyobb raktározó kompartmentum is a tartalék-anyagok, méregtelenítő termékek és a védekező anyagok számára [Boller és Viemken (1986)].

Emiatt nagyon előnyös lenne, ha az olyan proteineket, amelyek a növény tápanyag tartalmának növelésével vannak kapcsolatban, sikerülne célzottan a vakuólába irányítani, ott felhalmozni, mivel ez a növényi sejt messze legtágasabb kompart-

mentuma az oldott anyagok számára. Például a gumók, a hagymák, a gyökerek és a szárak legfontosabb raktározott proteinjai az ezeket a szerveket felépítő sejtek vakuóláiban találhatók [Boller és Wiemke (1986)]. Továbbá a legtöbb mag tartalék proteinjai az ún. "protein bodies"-ban helyezkednek el, ezek specializált vakuólák, amelyek számára ugyanazon "targeting"-szignálok lehetnek érvényesek, mint a vegetatív szervek vakuolái számára.

Hasonló megfontolások érvényesek azokra az anyagokra is, amelyeket kártevők vagy betegségek leküzdésére lehet alkalmazni, különösen, ha ezek az anyagok magára a növényre nézve toxikusnak bizonyulnak. Ennélfogva előnyös, ha ezeket az anyagokat is a növényi vakuólába tároljuk be.

Végül, meghatározott esetekben, a vakuóla, mint méregtelenítő szerv működik, amennyiben például a növény által szintetizált méregtelenítő termékeket tárolja [Boller és Wiemke (1986)]. Tehát arra törekszünk, hogy a méregtelenítő enzimeket szintén célzottan a vakuólába juttassuk be.

Pontosan fordított problémát jelent ezzel szemben például, ha a kultúrnövényeket gomba kórokozó támadja meg. Ezek megfertőzik a gazdanövényt, s micéliumaik a növény intercelluláris tereibe hatolnak be. Minthogy kórokozók leküzdésére bevethető kitinázok és glükánázok nagyon gyakran vakuolárisan fordulnak elő, biológiai hozzáférhetőségük az intercelluláris térben természetesen csak csekély. Ebben az esetben tehát kívánatos lenne, ha olyan helyzetben lennénk, hogy ezeket a proteinek

célzottan az extracelluláris kompartmentumba tudnánk kiszilipelni, hogy így ezeknek az anyagoknak a diszponibilitását az intercelluláris térben megnövelhessük, s hogy ilyen módon a gomba kórokozó hatékony leküzdését lehetővé tegyük.

Az extracelluláris térbe történő szekréció akkor is előnyös, ha meghatározott anyagokat sejt-tenyészet használatával kívánunk előállítani. Ebben az esetben a bejuttatott idegen proteineket, mivel ezek az extracelluláris térbe választódnak ki, igen egyszerűen izolálhatnánk a táptalajból. Így az intracelluláris termelésnél szükséges sejtfeltárást el lehetnek hagyni.

Eddig azonban nem sikerült a növényi vakuólák számára ilyen "targeting"-szignált azonosítani vagy éppen izolálni.

Tague és Chrispeels (1987) abból a feltevésből kiindulva, hogy a növényekben a proteineknek a vakuólába való bejuttatásához hasonló N-terminális "targeting"-szignált lehetne alkalmazni, mint az élesztőkben, a borsóból származó fitohemagglutinin molekula különböző részeit egy ripoerter-génnek kapcsolták össze és ezeket élesztőben vizsgálták. Megállapították, hogy élesztő gazdasejtben a fitohemagglutinin esetében is a molekula N-terminális része működik "targeting"-szignál gyanánt.

Egy további vakuóla proteint, a bázikus β -1,3-glükánázt egy olyan C-terminális szakasszal szintetizálták, ami a molekula érése folyamán elvész. Ugyanez vonatkozik a rizsből, árpából és a búzából (búzamag-agglutinin) előállított lektinek-re is. E szakasz funkciója eddig ismeretlen volt.

Minthogy a vakuólából származó különböző proteinek C-terminuszának összehasonlításából eddig ezen a területen nyíl-

vánvaló homológiát nem lehetett felismerni, az a hipotézis tartotta magát, hogy hasonlóan az élesztőkhöz, a meghatározó szignál-hatás a növényeknél is az N-terminuszból indul ki.

A találmány lényeges feladatát tehát egy olyan peptid-fragmentum ("targeting"-szekvencia) azonosításának és izolálásának a megoldása képezi, amely egy asszociált protein molekulának a növényi sejt vakuólába való bejuttatásáért felelős. A találmány további tárgyát képezi az említett peptid-fragmentumot kódoló DNS szekvencia azonosítása és izolálása.

Ezt a feladatot - részben ismert eljárások alkalmazásával - a találmány keretében meglepetésszerűen oldjuk meg.

Részletesebben kifejtve, a találmány egy olyan rövid peptid fragmentumra vonatkozik, amely egy tetszés szerinti asszociált protein molekulának a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős, továbbá az említett peptid fragmentumot kódoló DNS-re. Az említett asszociált protein molekula az alkalmazott "targeting"-szekvenciára vonatkoztatva homológ vagy heterológ eredetű protein lehet.

Előnybe helyezünk egy olyan rövid peptid fragmentumot, amely a természetben vakuolárisan előforduló egy protein molekula C-terminális szakaszából állítható elő és amelynek egy tetszés szerinti protein molekulával való asszociációja ennek a vakuólába való célzott bejutásához vezet. Hasonlóan előnybe helyezzük az említett peptid fragmentumot kódoló DNS-t, amely ennek megfelelően a természetben vakuolárisan előforduló protein molekulát kódoló megfelelő gén 3'-terminális szakaszából izolálható.

Különösen előnyös egy olyan rövid peptid fragmentum, amelyet a természetben vakuolárisan előforduló egy kitináz molekulából állítunk elő, s ez egy tetszés szerinti protein molekulával asszociálva a vakuólába való célzott bejutást idézi elő, hasonlóan előnyös az említett peptid fragmentumot kódoló DNS, amelyet ennek megfelelően egy növényi kitináz gén 3'-terminális szakaszából állítunk elő.

Egészen különösen előnyös egy olyan peptid fragmentum, amely "targeting"-szignálként működik a növényi vakuóla szempontjából és az 1-es és 2-es számú (SEQ ID NO: 1 és 2) alábbi aminosav szekvencia jellemzi:

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met

Ugyancsak előnyösek az említett peptid fragmentumot kódoló DNS szekvenciák, ezeket az 1-es számú (SEQ ID NO: 1) általános képlet írja le:

CGN/AGR TCN/AGW TTY GGN AAY GGN CTN/TTR TTR/CTN GTN GAY ACN ATG TAA,

amelyben

N jelentése A vagy G vagy C vagy T/U;

R jelentése G vagy A;

W jelentése A vagy T/U; és

Y jelentése T/U vagy C.

Azok a DNS szekvenciák az előnyösek, amelyek többségükben a növény részéről szívesen alkalmazott kodonokat tartalmazzák.

Különösen előnyös egy DNS szekvencia, amely lényegében tiszta formában fordul elő és amely például a *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növények egy bázikus kitináz génjének 3'-ter-

minális végéből (C-terminális szakasz) állítható elő és amely lényegében a 2-es számú (SEQ ID NO: 2) DNS szekvenciával írható le:

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

Előnyös továbbá egy olyan DNS szekvencia, amely lényegében tiszta formában fordul elő és amely például a *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növények egy bázikus glükánáz génjének 3'-terminális végéből (C-terminális szakasz) állítható elő és lényegében a következő, 12-es számú (SEQ ID NO: 12) DNS szekvencia jellemzi:

GTC TCT GGT GGA GTT TGG GAC AGT TCA GTT GAA ACT AAT GCT ACT
GCT TCT CTC GTA AGT GAG ATG TGA

Az említett DNS szekvencia által kódolt peptid fragmentum, amely mint "targeting"-szignál működik a növényi vakuóla szempontjából és az alábbi 12-es számú (SEQ ID NO: 12) aminosav szekvenciából áll, szintén a találmány tárgyát képezi:

Val Ser Gly Gly Val Trp Asp Ser Ser Val Glu Thr Asn Ala Thr
Ala Ser Leu Val Ser Glu Met

Hasonlóképpen a találmány tárgyát képezik a fent közelebbről megjelölt DNS szekvenciák lényegében homológ származékai, amelyek a találmány szerinti lényeges tulajdonságokat még tartalmaznak, azaz egy olyan C-terminális peptidet kódolnak, amely "targeting"-szignálként működik a növényi vakuólag szempontjából.

E találmány értelmében egy DNS szekvencia egy második DNS szekvenciával lényegében akkor homológ, ha a DNS szekvencia aktív

szeletei legalább 60 %-ban, előnyösen legalább 80 %-ban és egészen különösen előnyösen legalább 90 %-ban egymással/homológok.

A találmány szerinti DNS szekvenciák említett származékai természetben előforduló variánsok és mutánsok lehetnek, vagy pedig különösen olyanok, amelyek célzottan, ismert mutációs eljárások segítségével állíthatók elő.

Mutáció alatt egy vagy több bázis törlése, illetve beépítése értendő, valamint egy vagy több bázis cseréje, valamint ezen eljárások kombinációja. Az eljárás akkor érvényesül főleg, ha az említett bázis szubsztitúció olyan csendes mutációval jár, amit nem követ aminosav kicserélődés.

Ezeket a mutánsokat - amelyek ugyancsak a találmány tárgyát képezik - például az alábbiakban felsorolt, 3-7 számú (SEQ ID NO: 3-7) DNS szekvenciák képviselik. Az említett mutánsok oligonukleotid-közvetítette mutagenezissel állíthatók elő az 1-es és 2-es számú (SEQ ID NO: 1 és 2) alapszekvenciákból és olyan peptid fragmentumokat kódolnak, amelyek "targeting" tulajdonságuk szempontjából azonosak az említett alapszekvenciák által kódolt fragmentumokkal.

- (a) GGA AAA GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
- (b) GGA AAT GGA CTT TTA GTC AAT ACT ATG TAA
- (c) GGA AAT GGA CTT TTA GTC CGT ACT ATG TAA
- (d) A GAT CTT TTG GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
- (e) ATC GGT GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

Az (a), (b) és (c) szekvenciák üres helyei a mutált "targeting"-szekvenciának azt a területét jelentik, amely nem különbözik a kiindulási szekvenciától.

Ugyancsak a találmány tárgyát képezik az olyan peptid fragmentumok, amelyeket a fent ismertetett DNS szekvenciák kódolnak és amelyek ugyanolyan "targeting" tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a természetben előforduló, módosítatlan peptid fragmentumok, amelyeket az említett 1-es és 2-es számú (SEQ ID NO: 1 és 2) alapszekvenciák kódolnak.

Különösen előnyösek azok a peptid fragmentumok, amelyek a növényi vakuóláknál mint "targeting"-szignálok működnek, s aminosav szekvenciáik száma: 3-7 (SEQ IS NO: 3-7):

- | | |
|-----|---|
| (a) | Gly Lys Asp Leu Leu Val Asp Thr Met Vég |
| (b) | Gly Asn Gly Leu Leu Val Asn Thr Met Vég |
| (c) | Gly Asn Gly Leu Leu Val Arg Thr Met Vég |
| (d) | Asp Leu Leu Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met Vég |
| (e) | Ile Gly Asp Leu Leu Val Asp Thr Met Vég |

Az (a), (b) és (c) szekvenciáknál az üres helyek a mutált "targeting"-szekvenciánál azt a területet jelentik, amely nem különbözik a kiindulási szekvenciától.

A példák felsorolása semmiképpen nem korlátozó értelmű, pusztán annak a bemutatására szolgál, hogy a fenti, előnyösnek mondott szekvenciákat a szakemberek könnyen előállíthatják anélkül, hogy e szekvenciák találmány szerint lényeges tulajdonságai elvesznének.

Ugyancsak a találmány részét képezik az olyan fragmentumok vagy rész-szekvenciák, amelyek a fent részletezett DNS

szekvenciákból vagy ezen DNS szekvenciák származékaiból állíthatók elő és még a kiindulási szekvenciák specifikus tulajdonságaival rendelkeznek.

A találmány értelmében különösen előnyös DNS fragmentumok a 2-es számú (SEQ ID NO: 2) találmány szerinti DNS szekvenciából állíthatók elő és a 8-as és 9-es számú (SEQ ID NO: 8 és 9) következő nukleotid szekvenciákkal rendelkeznek:

CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

A fenti DNS szekvenciák olyan peptid fragmentumokat kódolnak, amelyek a növényi vakuólák számára mint "targeting"-szignálok működnek és a 8-as és 9-es számú (SEQ ID NO: 8 és 9) aminosav szekvenciát tartalmazzák:

Leu Leu Val Asp Thr Met vég

Gly Leu Leu Val Asp Thr Met vég

Az említett peptid fragmentumok tehát szintén e találmány részét képezik.

További tárgyát képezik a jelen találmánynak az olyan kiméra genetikai szerkezetű rekombináns DNS molekulák, amelyekben egy tetszés szerinti kifejezhető DNS egy találmány szerinti DNS szekvenciával, például a növényi sejtekben működő expressziós szignálokkal és adott esetben a 3'- és/vagy 5'-szakasz további kódoló és/vagy nem kódoló szekvenciáival olyan funkcionális kapcsolatban van, hogy egy növényi gazdasejt transzformációjakor az expressziós terméknek a növényi vakuólába való bejutása valósul meg.

Itt az az előnyös, ha a kifejezhető DNS 5'-terminális szakaszában egy olyan szekvenciát tartalmaz vagy pedig egy olyan szekvenciával van összekapcsolva, amely egy, a növényi sejtben működőképes, N-terminális szignálpeptidet kódol. Ezenkívül a DNS molekula további olyan peptid fragmentumokat kódoló szekvencia részleteket tartalmazhat, amelyek összességükben ahhoz vezetnek, hogy a vakuólába való föl vételének hatékonyságát javítja, mint például a Matsuoka és Nakamura által a sporamin N-terminális szakaszában felfedezett propeptid fragmentum [K. Matsuoka, K. Nakamura (1991)].

A találmány részét képezik a találmány szerinti rekombináns DNS molekulákat tartalmazó klónozó, transzformációs és expressziós vektorok, valamint az említett vektorokkal transzformált gazda szervezetek.

A találmány további tárgyát képezik az említett találmány szerinti rekombináns DNS molekulákat tartalmazó "shuttle" (ingázó) vektorok vagy biner vektorok, amelyek mind *E.coli*-ban, mind *A. tumefaciens*-ben stabilan képesek replikálódni.

A gazda szervezetek főként növényi gazdák, mégpedig előnyösen a következők: növényi protoplasztok, sejtek, kallusz, szövetek, szervek, zigóták, embriók, pollén és/vagy mag, valamint főként a teljes - előnyösen termékeny - növények, amelyek az említett rekombináns DNS-sel vannak transzformálva. A teljes növények a találmány szerinti rekombináns DNS molekulával vagy direkt transzformálhatók vagy pedig az előzőleg transzformált protoplasztokból, sejtekből és/vagy szervekből regenerálás révén nyerhetők.

Különösen előnyösek az átvitt gént tartalmazó (transzgenikus) növények, leginkább azonban az olyan transzgenikus termékeny növények, amelyek egy találmány szerinti szerkezetet tartalmaznak, és amelyeknél a kifejezett génterméket, mint kívánt, a vakuóla tartalmazza.

A transzgenikus növények mindenkor utódgenerációi szintén a találmány részét képezik, amikor is az említett transzgenikus növény egy találmány szerinti rekombináns DNS molekulával való direkt transzformáció révén jött létre, vagy pedig előzőleg transzformált protoplasztokból, sejtekből, kalluszból, szövetből, szervekből, zigótákból, embriókból, pollénből és/vagy magból regenerálás révén kaptuk meg. Megjegyzendő, hogy a felsorolás nem korlátozó értelmű.

A találmány értelmében szaporítóanyag alatt minden olyan növényi anyagot értünk, amely szexuálisan vagy aszexuálisan vagy in vitro vagy in vivo szaporítható, s itt előnybe helyezzük a találmány szerinti transzgenikus növényből származó protoplasztokat, sejteket, kalluszokat, szöveteket, szerveket, embriókat, zigótákat, petesejteket, pollént vagy magot. A találmány további tárgyát képezik az említett növények utódai, valamint ezek mutánsai és variánsai, beleértve azokat, amelyek olyan növényekből származnak, amelyeket szomatikus sejt-fúzió, genetikai módosítás vagy mutánsok szelekciója révén kaptunk.

A találmány ezenkívül az alábbi eljárásokra vonatkozik:

- (a) a találmány szerinti DNS szekvenciák előállítására;
- (b) a találmány szerinti azon rekombináns DNS molekulák előállítására, amelyek a fenti, találmány szerinti DNS szekven-

ciákat egy tetszés szerinti, kifejezhető DNS szekvenciával funkcionális kapcsolatban tartalmazzák, ahol az említett DNS szekvencia előnyösen növényi expressziós szignálok szabályozó ellenőrzése alatt áll;

(c) az említett, találmány szerinti rekombináns DNS molekulákat tartalmazó klónozó, transzformációs és/vagy expressziós vektorok előállítására;

(d) transzformált gazdaszervezetek előállítására, főként olyan gazdák előállítására, amelyeket a következő csoportból választunk ki: növényi protoplasztok, sejtek, kalluszek, szövetek, szervek, zigóták, embriók, pollének és/vagy magok, valamint a teljes, előnyösen termékeny növények;

(e) szaporítóanyag előállítására transzformált növény anyagból, főként szexuális és aszexuális utódgeneráció előállításához.

Ugyancsak a találmány oltalmi körébe tartozik egy olyan eljárás, amely expressziós termékeknek a növényi vakuólákba való célzott bejuttatását teszi lehetővé és amelyet lényegében a következők jellemeznek:

(a) legelőször megfelelő forrásból a vakuólába való célzott bejuttatásért felelős DNS szekvenciát izoláljuk vagy ismert eljárásokkal szintetizáljuk;

(b) az említett DNS szekvenciát egy tetszés szerinti, kifejezhető DNS szekvencia 3'-terminális végébe építjük be;

(c) a kész szerkezetet növényi expressziós vektorba klónozzuk be, a növényben aktív expressziós szignál szabályozása alá;

(d) az említett expressziós vektor a növényi gazdát transzformálja és ott kifejeződik.

Előnyös, ha a kifejezhető DNS 5'-terminális szakasza egy olyan szekvenciát tartalmaz vagy pedig egy olyan szekvenciával van funkcionális kapcsolatban, amely egy, a növényi sejtben működőképes, N-terminális szignálpeptidet kódol. Ezenkívül a DNS molekula további peptid fragmentumokat kódoló szekvencia részeket tartalmazhat, amelyek hozzájárulnak a vakuólába való felvétel hatékonyságának a javításához, mint például a K. Matsuoka és K. Nakamura által a sporamin N-terminális szakaszában felfedezett propeptid fragmentum [K. Matsuoka és K. Nakamura (1991)].

A találmány keretében végzett vizsgálatok folyamán kiderült, hogy azok a proteinek, amelyek természetesen tartalmaznak egy találmány szerinti "targeting"-szekvenciát és így normál módon jutnak be a vakuólákba, a találmány szerinti szignál-szekvencia elvesztésekor az extracelluláris térbe szecernálódnak.

A találmány további tárgyát jelenti tehát egy olyan eljárás, amelynek segítségével azokat a proteineket, amelyek természetes "targeting"-szekvenciát tartalmaznak, és így rendszerint valamely sejt-kompartmentumba, főként vakuólákba jutnak be, onnan a növény extracelluláris terébe juttassuk. Az eljárást lényegében a következők jellemzik:

- (a) izolálunk egy ilyen proteint, legfőképpen azonban egy vakuola proteint kódoló DNS-t izolálunk;
- (b) a nyílt leolvasási keretből, annak C-terminális végéről eltávolítjuk a mindenkor celluláris kompartmentumba való felvételért felelős "targeting"-szekvenciát, például úgy, hogy közvetlenül a C-terminális szakasz elé egy stop kodont iktatunk

be vagy eltávolítjuk a C-terminális szakaszt;

(c) az említett mutagenizált DNS szekvenciát egy megfelelő növényi expressziós vektorba építjük be; és

(d) a kész szerkezettel növény-gazdát transzformálunk.

DEFINÍCIÓK

A következőkben egy sor olyan kifejezést használunk, amelyek a rekombináns DNS technológiában, valamint a növény-genetikában használatosak. Annak érdekében, hogy a leírásnak, az igénypontoknak, valamint annak a körnek, amelyre az említett kifejezések vonatkoznak a helyes és egységes megértését biztosítsuk, a következő definíciókat alkalmazzuk.

Növényi anyag: Életképes növényi részek, mint protoplasztok, sejtek, kallusz, szövetek, embriók, növényi szervek, bimbók, magok, mint ilyenek, vagy tenyészeik, valamint az egész növény.

Növényi sejt: A növény szerkezeti és élettani egysége, mely protoplaszthól és sejtfalból áll.

Protoplaszt: Növényi sejtből vagy szövetből izolált, sejtfal nélküli "csupasz" növényi sejt, mely sejtklónná vagy egy egész növényé képes regenerálódni.

Növényi szövet: Növényi sejtek csoportja, amelyek szerkezeti és funkcionális egységet alkotó formává szerveződnek.

Növényi szerv: Többféle szövetből álló szerkezeti és funkcionális egység, ilyen például a gyökér, törzs, levél vagy embrió.

Heterológ gén(ek) vagy DNS: DNS szekvencia, amely speciális terméket vagy termékeket kódol vagy egy biológiai funkciót tölt be és amely más fajból származik, mint amibe a szóbanforgó gént bevittük; az említett DNS szekvenciát idegen génnek vagy idegen DNS-nek is nevezik.

Homológ gén(ek) vagy DNS: DNS szekvencia, amely speciális terméket vagy termékeket kódol vagy egy biológiai funkciót tölt be és amely ugyanabból a fajból származik, mint amibe a szóbanforgó gént bevittük.

Szintetikus gén(ek) vagy DNS: DNS szekvencia, amely speciális terméket vagy termékeket kódol vagy egy biológiai funkciót tölt be és amelyet szintetikus úton állítottunk elő.

Növényi promoter: a DNS kifejeződését szabályozó szekvencia, amely egy növényben minden tetszőleges homológ vagy heterológ DNS génszekvencia transzkripcióját biztosítja, ha a szóbanforgó génszekvencia funkcionálisan kapcsolódik egy ilyen promoter-hez.

Terminátor szekvencia: Egy transzkripciós egység végén lévő DNS szekvencia, amely a transzkripció folyamatának végét jelzi.

Intenzív-működésű növényi promoter (OPP): Növényi promoter, amely egy transzgenikus növényi sejtben a vele funkcionálisan összekapcsolt minden működőképes génszekvencia expressziójára oly mértékben hat (a mérés RNS formában vagy polipeptid mennyiségben történik), hogy az jelentősen intenzívebbé válik, mint általában azokban a gazdasejtekben, amelyek nem az említett OPP-vel vannak transzformálva.

3'/5' nem transzlatált szakasz: A kódoló szakasztól 3'/5' irányban található olyan DNS szakaszok, amelyek bár átíródnak mRNS-sé, mégsem fordítódnak át polipeptiddé. Ez a szakasz szabályozó szekvenciákat tartalmaz, ilyen például a riboszómakötő hely (5') vagy a poliadenilációs szignál (3').

DNS-klónozó vektor: Klónozó hordozó, ilyen például egy plazmid vagy egy bakteriofág. Ezek az összes olyan szignálszekvenciát tartalmazzák, amelyek egy megfelelő gazdasejtbe beépített DNS klónozásához szükségesek.

DNS-expressziós vektor: Klónozó hordozó, ilyen például egy plazmid vagy egy bakteriofág. Ezek az összes olyan szignálszekvenciát tartalmazzák, amelyek egy megfelelő gazdasejtbe beépített DNS expressziójához szükségesek.

DNS-transzfer vektor: Transzfer-hordozó, ilyen például egy Tiplazmid vagy egy vírus, amely lehetővé teszi, hogy a genetikai anyagok egy alkalmas gazdasejtbe beépüljenek.

Transzgenikus növények mutánsai és variánsai: Transzgenikus növényekből spontán keletkező vagy pedig mesterségesen, ismert eljárások - például UV-kezelés, mutagén szerekkel való kezelés - alkalmazásával előállított származék, amely még a kiindulási növény találmány szerinti jellegét és tulajdonságait mutatja.

Lényegében tiszta DNS szekvencia: DNS szekvencia, amelyet lényegében tiszta formában természetes vagy nem természetes forrásból izolálunk. Ilyen szekvencia természetes rendszerben is előfordulhat, például baktériumokban, vírusokban vagy növényi vagy állati sejtekben vagy pedig rendelkezésre állhat szintetikus DNS formájában vagy származhat cDNS-ből.

A lényegében tiszta DNS-t rendszerint vektor formájában izoláljuk, amely az említett DNS-t inszertumként tartalmazza. A lényegében tiszta azt jelenti, hogy más DNS szekvenciákat csak elhanyagolható mértékben tartalmaz, például 5 %-nál ki-

sebb, előnyösen 1 %-nál kisebb és egész különösen előnyösen 0,1 %-nál kisebb mennyiségben. Ezek a szekvenciák és az ezen szekvenciákat tartalmazó vektorok általában vizes oldatban állnak rendelkezésre, mégpedig puffer oldatban vagy egy általánosan használt tápoldatban.

A találmány keretében először tudtunk azonosítani és izolálni egy rövid peptid fragmentumot kódoló konkrét DNS szekvenciát, amely egy tetszőleges, asszociált génterméknek a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáért felelős. Az említett találmány szerinti DNS szekvencia izolálásához előforduló proteinek, cDNS és/vagy genomiális DNS klónok, mint például egy növényi kitináz vagy glükánáz klón.

A találmány elsősorban tehát egy gén 3'-terminális szakaszából előállítható új, lényegében tiszta DNS szekvenciára vonatkozik, amely egy természetben vakuolárisan előforduló proteint kódol és amely egy tetszőleges, kifejezhető DNS-sel funkcionálisan összekapcsolva olyan génterméket eredményez, amelyet célzottan a növényi vakuóla vesz fel. A találmány az említett DNS szekvencia mutánsaira és variánsaira is vonatkozik.

A találmány szerint különösen előnyös a növényi kitináz gén 3'-terminális szakaszából előállítható DNS szekvencia. Hasonlóan előnyös a növényi glükánáz gén 3'-terminális szakaszából előállítható DNS szekvencia is.

Egy alkalmas gén, különösen a találmány szerinti DNS szekvencia forrásául szolgáló alkalmas kitináz vagy glükánáz gén izolálásakor előnyösen genomiálisan vagy cDNS géntárakból

indulunk ki. Ezeket a géntárakat általánosan használt, a terület szakemberei előtt jól ismert rutin eljárásokkal állíthatjuk elő. A genomiális vagy cDNS géntárak előállításának alapeljárásait például Maniatis és munkatársai (1982) írták le részletesen, míg ezen eljárás növényi rendszerre való adaptálásának és alkalmazásának az adatait például Mohnen (1985) közleménye tartalmazza.

A genomiális DNS és cDNS különbözőképpen izolálható. A genomiális DNS például megfelelő sejtekből, ismert eljárások segítségével kivonható és tisztítható.

A jelen találmány egy speciális kiviteli formája szerint a cDNS előállításánál rendszeren mRNS-ből indulunk ki, amelyet kiválasztott sejtekből vagy szövetekből tudunk izolálni, különösen pedig olyan sejtekből vagy szövetekből, amelyek közismerten nagy koncentrációban tartalmazzák a természetben vakuolárisan előforduló proteineket, így főként a kitinázt, illetve a glükánázt tartalmazzák nagy koncentrációban. Az izolált mRNS ezután templátként alkalmazható reverz transzkripció folyamatban a megfelelő cDNS előállítására.

A cDNS előállítására különösen előnyös találmány szerinti kiindulási anyagok a növényi sejtek vagy szövetek vagy egyéb alkalmas növényi anyagok, amelyeket előzőleg megfelelő eljárások segítségével magas kitináz, illetve glükánáz szint termelésére készítettünk. Ezt például úgy tudjuk elérni, hogy tenyésztett sejteket vagy szövetet vagy egyéb alkalmas növényi anyagot hormon-mentes tápoldatra oltunk le és ott tenyésztjük annyi ideig, amennyi a magas kitináz, illetve glükánáz szint indukciójához szükséges.

Igen előnyös e találmány szerint egy olyan alaptáptalaj, amely a sókat és a tiamin.HCl-t Linsmaier és Skoog (1965) által javasolt koncentrációban tartalmazza (LS táptalaj). A poli(A⁺)RNS izolálására és a cDNS előállítására szolgáló eljárásokat a szakemberek ismerik és ezeket az alább következő példákban részletesen ismertetjük.

Ezután a kivont és tisztított DNS készítményeket az ezt követő klónozáshoz fragmentáljuk. Egy klónozó vektorba való beépítéshez a klónozendó genomiális DNS vagy cDNS alkalmas nagyságra történő fragmentálását vagy mechanikus nyírással vagy pedig előnyösen megfelelő restrikciós enzimekkel való hasítással végezzük. A genomiális és/vagy cDNS géntárak előállításához már rutinszerűen alkalmazott megfelelő klónozó vektorok között vannak a fág-vektorok, ilyenek a λ -Charon fágok vagy pedig a bakteriális vektorok, mint az E.coli eredetű pBR322 plazmid. A szakemberek előtt ismertek a további alkalmas klónozó vektorok.

Az ilyen módon előállított géntárakból egy szűrő-program segítségével, például alkalmas oligonukleotid szondákkal (szonda-molekulák) megkereshetjük a kívánt gént - például egy kitináz vagy glókanáz gént, vagy ezek részeit - tartalmazó megfelelő klónt, amelyet ezután izolálhatunk. A megfelelő klónok felkutatására különböző módszerek állnak rendelkezésre, ilyen például a differenciáló telep-hibridizálás vagy a plakk hibridizálás. Használatosak az olyan immunológiai kimutatási módszerek is, amelyek a specifikus transzlációs termék azonosításán alapulnak.

Szonda-molekula gyanánt például ugyanabból a génből vagy pedig egy struktúráisan rokon génből már előzőleg izolált DNS fragmentumot alkalmazhatunk, amely az azonosítandó kívánt génen belül a megfelelő szekvencia darabbal képes hibridizálni.

Mihelyt az izolálendő gén aminosav szekvenciája vagy a szekvenciának legalább részei ismertté válnak, a szekvencia adatok birtokában megtervezhetjük a megfelelő korrespondáló DNS szekvenciát. Tekintve a genetikai kód ismert degenerált voltát, az esetek többségében egy-ugyanazon aminosavhoz különböző kodonok használhatók. Ennek következtében, kevés kivételtől eltekintve, általában egy meghatározott aminosav szekvenciát egy sor egymáshoz hasonló oligonukleotid kódol. Itt azonban figyelemmel kell lenni arra, hogy ezen oligonukleotid sorozatnak csak egy tagja felel meg valóban a keresett génen belüli megfelelő szekvenciának. Hogy a lehetséges oligonukleotidok számát már előre korlátozzuk, például a kodonok használatára vonatkozó, R. Lathe és mtsai (1985) által felállított szabályt alkalmazzuk. Ez a szabály számításba veszi, hogy egy adott kodont milyen gyakorisággal használnak a valóságban az eukarióta sejtek.

Ezeknek az ismereteknek az alapján tervezzük meg azokat az oligonukleotid molekulákat, amelyeket szonda-molekulák gyanánt használhatunk a megfelelő klón azonosítására és izolálására, amikor is az említett szonda-molekulát az előbb leírtak szerint a genomális DNS-sel vagy cDNS-sel hibridizáljuk.

Hogy a kívánt gén, például egy kitináz vagy glükánáz kódoló gén kimutathatóságát megkönnyítsük, az előbbieken említett DNS szonda-molekulát egy alkalmas, könnyen kimutatható

csoporttal jelezhetjük. Kimutatható csoport alatt - a találmány szerint - minden olyan anyag értendő, amely meghatározott, könnyen azonosítható fizikai vagy kémiai tulajdonsággal rendelkezik.

Ezeket az anyagokat már széleskörben alkalmazzák főleg az immun-assayk területén és az esetek többségében ebben a bejelentésben is alkalmazhatók. Itt kiváltképpen az enzimatikusan aktív csoportokat említjük: ilyenek az enzimek, enzim-szubsztrátumok, koenzimek és enzim-gátlók, továbbá a fluoreszkáló és lumineszkáló szerek, kromofórok, radioizotópok, mint például a ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}J és ^{14}C . Ezeknek a markereknek a könnyű kimutathatósága egyrészt inherens fizikai tulajdonságaikon alapul (például a fluoreszcens-markerek, kromofórok, radioizotópok), másrészt reakciókészségükön és kötőképeségükön (például az enzimek, szubsztrátumok, koenzimek, inhibitorok).

Szonda-molekula gyanánt egy magas kitináz, illetve glükánáz szint termelésére indukált szövetből vagy sejtből izolált poli(A^+) RNS-ből származó egyszálú cDNS is megfelelő.

A hibridizálásra vonatkozó általános eljárásokat például T. Maniatis és mtsai (1982) és B.T.Haymes és mtsai (1985) ismertették.

A fent említett géntárakból azokat a klónokat, amelyek egy szonda-molekulával hibridizálnak és amelyek egy fent említett kimutatási eljárással azonosíthatók, ezután tovább analizálhatjuk a kódoló szekvencia méretének és természetének a megállapítása céljából.

Egy másik eljárás, amely gének klónozására, mindenekelőtt kitináz vagy glükánáz gének klónozására szolgál, egy expressziós vektorokból felépített géntár konstrukcióján alapul. Ebben az esetben a már előbb leírt eljárással analóg módon, először genomiális DNS-t, előnyösen azonban cDNS-t izolálunk egy olyan sejtből vagy szövetből, amely képes a kívánt génterméket - jelen esetben kitinázt vagy glükánázt - kifejezni, majd egy megfelelő expressziós vektorba juttatják be. Az ilyen módon előállított géntárat ezután megfelelő eljárások segítségével, előnyösen antitestek alkalmazásával, például anti-kitináz vagy anti-glükánáz antitestekkel szűrjük, majd kiválasztjuk azokat a klónokat, amelyek a kívánt gént vagy legalább e gén egy részét, mint inszertumot tartalmazzák.

Az előbbieken leírt eljárás segítségével tehát olyan gént tudunk izolálni, amely egy természetben előforduló vakuoláris génterméket kódol, így például egy növényi kitináz vagy glükánáz gént, legfőképpen azonban bázikus kitináz vagy glükánáz gén izolálására nyílik lehetőség. Ezek a gének C-terminális szakaszukban olyan DNS szekvenciát tartalmaznak, mely egy tetszőleges strukturális génnel funkcionális kapcsolatban a génterméknek a transzformált növényi anyag vakuóláiba való felvételét teszi lehetővé.

További jellemzés céljából a fent leírtak szerint tisztított és izolált DNS szekvenciákat szekvencia analízisnek vethetjük alá. Ezért először az izolált DNS-t alkalmas restriktációs enzimek segítségével fragmentumokra hasítjuk, majd

megfelelő klónozó vektorokba - például ilyenek az M13mp18 és mp19 vektorok - beklónozzuk. A szekvenálást 5'→3' irányban végezzük el, amikor is előnyösen a Sanger féle [Sanger és mtsai (1977)] didezoxi-láncterminációs módszert vagy a Maxam és Gilbert szerinti [Maxam és Gilbert (1980)] eljárást alkalmazzuk. Hogy a szekvenálásnál elkerüljük a hibákat, előnyös, ha mindkét szálát parallel szekvenáljuk. A nukleotid- és a megfelelő aminosav-szekvencia analízishez előnyösen komputer segítségét vesszük igénybe megfelelő, kereskedelemben kapható komputer software használatával (például: a Wisconsin Egyetem GCG szoftware-e).

A fentiek szerint előállított DNS klónokból, elsősorban pedig a kitináz vagy glükánáz klónokból ezután igen könnyen - általánosan ismert eljárások alkalmazásával - izolálhatjuk a találmány szerinti DNS szekvenciákat.

A találmány szerint kiváltképpen előnyös egy olyan DNS szekvencia, mely lényegében tiszta formában fordul elő és amely például a *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növényből származó egy bázikus kitináz gén 3'-végéből (C-terminális szakasz) állítható elő és lényegében a 2-es számú (SEQ ID NO:2) DNS szekvencia jellemzi:

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

A fenti DNS szekvencia egy olyan peptid fragmentumot kódol, amely egy protein molekulával funkcionális kapcsolatban a növényi vakuóla számára mint "targeting"-szignál működik és a 2-es számú (SEQ ID NO:2) alábbi aminosav szekvenciából áll:

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met

Az említett peptid-fragmentum szintén a találmány részét képezi.

Ugyancsak előnyösnek tartunk egy olyan DNS szekvenciát, amely lényegében tiszta formában fordul elő és például a *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növény egy bázikus glükánáz génje 3'-terminális végéből (C-terminális szakasz) állítható elő és lényegében a 12-es számú (SEQ ID NO:12) alábbi DNS szekvencia írja le:

GTC TCT GGT GGA GTT TGG GAC AGT TCA GTT GAA ACT AAT GCT ACT
GCT TCT CTC GTA AGT GAG ATG TGA

Az említett DNS szekvencia által kódolt peptid-fragmentumot, amely egy kifejezhető DNS szekvenciával funkcionális kapcsolatban a növényi vakuóla számára mint "targeting"-szignál működik, a 12-es számú (SEQ ID NO: 12) alábbi aminosav szekvencia írja le és ugyancsak a találmány részét képezi:

Val Ser Gly Gly Val Trp Asp Ser Ser Val Glu Thr Asn Ala Thr
Ala Ser Leu Val Ser Glu Met

Magától értetődik, hogy a már ismert bázis-sorral rendelkező találmány szerinti DNS szekvenciát nem kell mindig újból egy alkalmas kitináz, illetve glókanáz szekvenciából előállítani. Természetesen ezek mindenkor nagyon egyszerűen, ismert kémiai eljárások segítségével szintetikusan is előállíthatók. A rövid DNS oligonukleotidok szintéziséhez alkalmas eljárások, mint például a foszfo-tioészter módszer vagy a foszfit módszer, a szakemberek előtt ismertek. Az oligonukleotid szintézisek manapság nagyrészt gépesítettek és automatizáltak, úgyhogy a rövid DNS fragmentumok rövid idő alatt

előállíthatók.

Ugyanez vonatkozik a "targeting"-peptid aminosav szekvenciájára is, amely a bázis szekvenciából közvetlenül levezethető.

A fent említett, találmány szerinti DNS szekvenciából egy vagy több bázispár deléciója, inszerciója vagy kicserélése révén igen egyszerűen előállíthatjuk e szekvenciák variánsait vagy mutánsait és ellenőrizhetjük, hogy mint "targeting"-szekvenciák megfelelnek-e.

E találmány keretében számos olyan szekvenciát ismeretünk, amelyeket a természetben előforduló kiindulási szekvenciából mutagenizálással nagyon könnyen előállíthatunk.

Ilyenkor úgy járunk el, hogy először a gént azonosítjuk és izoláljuk, hogy megkapjunk egy találmány szerinti DNS szekvenciát. Ezt a gént, különösen azonban a 3'-terminális "targeting"-szekvenciát, megfelelő klónozó vektorba való bevezetés után ismert eljárások segítségével módosíthatjuk. Speciális mutánsok előállítására különösen alkalmas az ún. oligonukleotid-közvetítette mutagenézis. Ez esetben rövid oligonukleotid fragmentumokat szintetizálunk, amelyek ugyan a vad típusu szekvenciával lényegében homológok, azonban egyes nukleotidjai ettől eltérőek. Az említett különbségek esetén inszerciókról, deléciókról, inverziókról vagy egy vagy több nukleotid cseréjéről vagy az előbb említett eljárások kombinációjáról lehet szó. Ezután - általánosan ismert módszerekkel - ezekkel a mután fragmentumokkal cseréljük ki a vad típusu génben a homológ darabokat. A kész szerkezetet

ekkor - mint előzőleg leírtuk - alkalmas növényi expresz-sziós vektorba klónozzhatjuk be és ezzel egy növényt transz-formálhatunk.

Egy DNS fragmentum mutagenizálását azonban előnyösen polimeráz láncreakció (PCR = polymerase chain reaction) alkalmazásával is elvégezhetjük. Ebben az in vitro eljárásban kémiaiilag szintetizált oligonukleotidokat használunk, amelyek rendszerint a mutagenizálandó DNS fragmentum szélén lévő területekről származnak és szál-specifikusak. Megfelelő körülmények között az oligonukleotid a denaturálás révén kapott egyszálú DNS komplementer területeivel hibridizál. Az így keletkező kétszálú darabok primerként szolgálnak az ezt követő polimeráz reakcióhoz.

Itt E.coliból származó DNS-polimerázokon kívül leginkább termofil baktériumokból - például a *Thermus aquaticus*-ból - származó hőstabil polimerázok alkalmazhatók.

A jelen találmány nem korlátozódik a fentiekben közelebb-ről meghatározott bázis-sorokra, hanem magába foglalja e DNS szekvenciák összes mutánsait és/vagy variánsait, amelyek egy vagy több bázis deléciója, illetve inszerciója vagy pedig főként egy vagy több bázis cseréje révén állíthatók elő és amelyek még a kiindulási szekvencia specifikus, találmány szerinti tulajdonságaival rendelkeznek.

A találmány keretében kiváltképpen előnyösek azok a variánsok, amelyek az 1-es és 2-es számú (SEQ ID NO: 1 és 2) kiindulási szekvenciákból oligonukleotid-közvetítette mutagenézissel állíthatók elő és olyan peptideket kódolnak, ame-

lyek még ugyanazt a "targeting"-tulajdonságokat mutatják, mint az említett kiindulási szekvenciák által kódol peptidek

(SEQ ID NO: 3-7):

- (a) GGA AAA GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
- (b) GGA AAT GGA CTT TTA GTC AAT ACT ATG TAA
- (c) GGA AAT GGA CTT TTA GTC CGT ACT ATG TAA
- (d) A GAT CTT TTG GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
- (e) ATC GGT GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

Az (a), (b) és (c) szekvenciákban az üres helyek a mutatott "targeting"-szekvencia azon területére vonatkoznak, amelyek nem különböznek a kiindulási szekvenciától.

Az előbbieken leírtak szerint izolálható, illetve előállítható DNS szekvenciákat most már fel lehet használni az azonos funkciójú homológ DNS szekvenciák felkutatására úgy, hogy például először előállítunk genomiális vagy cDNS géntárakat, amelyeket a találmány szerinti DNS szekvenciákkal, mint szondamolekulákkal átvizsgálunk, hogy tartalmazznak-e olyan homológ DNS szekvenciákat, amelyek ezekkel a szondamolekulákkal hibridizálnak.

Az azonos funkciójú homológ DNS szekvenciák felkutatására szolgáló ezen eljárás szintén a találmány részét képezi.

Vonatkozik a jelen találmány olyan peptid fragmentumokra is, amelyeket a fent említett DNS szekvenciák kódolnak és amelyek még ugyanazon "targeting" tulajdonsággal rendelkeznek, mint a természetben előforduló, módosítatlan peptid fragmentumok, amelyeket az említett 1-es és 2-es számú (SEQ ID NO: 1 és 2) alapszekvenciák kódolnak.

Különösen előnyösek azok a peptid fragmentumok, amelyek a növényi vakuólák számára "targeting"-szignálként működnek és a 3-7 számú (SEQ ID NO: 3-7) aminosav szekvenciákkal rendelkeznek:

- (a) Gly Lys Asp Leu Leu Val Asp Thr Met Vég
- (b) Gly Asn Gly Leu Leu Val Asn Thr Met Vég
- (c) Gly Asn Gly Leu Leu Val Arg Thr Met Vég
- (d) Asp Leu Leu Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met Vég
- (e) Ile Gly Asp Leu Leu Val Asp Thr Met Vég

Az (a), (b) és (c) szekvenciákban az üres helyek a mutált "targeting"-szekvenciák azon területére vonatkoznak, amelyek nem különböznek a kiindulási szekvenciától.

A találmány magába foglalja továbbá azokat a fragmentumokat vagy rész-szekvenciákat, amelyek a fentiekben részletezett DNS szekvenciákból vagy ezen DNS szekvenciák származékai-ból állíthatók elő és amelyek még a kiindulási szekvenciák specifikus tulajdonságaival rendelkeznek.

Kiváltképpen előnyösek azok a találmány szerinti DNS fragmentumok, amelyek a találmány szerinti DNS szekvenciákból állíthatók elő és lényegében a következő, 8-as és 9-es számmal rendelkeznek:

CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

E fenti DNS szekvenciák olyan peptid fragmentumokat kódolnak, amelyek a növényi vakuólák számára mint "targeting"-

-szignálok működnek, s a 8-as és 9-es számú (SEQ ID NO: 8 és 9) aminosav szekvenciával írhatók le:

Leu Leu Val Asp Thr Met

Gly Leu Leu Val Asp Thr Met

Az említett peptid fragmentumok szintén a találmány tárgyát képezik.

A jelen találmány keretében sikerült először kimutatni, hogy a fent részletesen jellemzett, találmány szerinti DNS szekvenciák - amelyek egy rövid, C-terminális peptid fragmentumot kódolnak, s a velük természetes kapcsolatban lévő strukturális gén célzott bejuttatásáért (a vakuólába) felelősek - képesek arra, hogy heterológ génekkel összekapcsolva is teljesítik "targeting" funkciójukat.

A találmány egy speciális kiviteli formája szerint a találmány szerinti DNS szekvenciát az előbbiekben leírt módszerek segítségével egy heterológ génnel, előnyösen egy olyan heterológ kitináz génnel, amelynek nincs megfelelő 3'-terminális szekvenciája, mesterségesen összekapcsolunk, majd ezzel egy növényi gazdát transzformálunk. Ezen transzformált gazdanövényem belül olyan géntermék fejeződik ki, amelyet célzottan a növényi vakuóla vesz fel.

Részletesen kifejtve, úgy járhatunk el, hogy először egy alkalmas növény-anyagból cDNS géntárat állítunk elő és az említett géntárból alkalmas szondamolekulák segítségével egy megfelelő kitináz-cDNS klónt izolálunk, amelynek nincs 3'-terminális szakasza. Miután e cDNS klónt megfelelő klónozó vektorba vittük be, az említett klónt restriktációs hasítási

helyek beépítése , illetve törlése segítségével úgy módosíthatjuk, hogy a találmány szerinti DNS "targeting"-szekvencia és a heterológ kitináz gén között funkcionális kapcsolat jöjjön létre. A kész szerkezetet ezután egy alkalmas növényi expressziós vektorba klónozzhatjuk be, ahol a növényben működő expressziós szignál szabályozása alá kerül. Itt említhetjük meg például a pGY1 növényi expressziós vektort, amely a CaMV vírus 35S promoterét, valamint ennek terminátor szekvenciáját tartalmazza. Az említettekkel azonban semmiképpen nem korlátozzuk a találmány oltalmi körét, s természetesen minden más alkalmas vektor is felhasználható.

Lehetségesség válik tehát, hogy például egy uborkából származó savanyú kitinázt, amely C-terminális "szignál-peptid"-et nem tartalmaz és ezért szokásos módon az extracelluláris térbe szecernálódik, a találmány szerinti "targeting"-szekvenciával összekapcsolva, célzottan a növényi vakuólába juttassunk be.

Tehát további tárgyát képezik e találmánynak az olyan kiméra, rekombináns DNS molekulák, amelyek egy kifejezhető DNS-t - kiváltképpen azonban egy strukturális gént, előnyösen egy heterológ strukturális gént - a találmány szerinti DNS szekvenciával és a növényi sejtekben aktív expressziós szignálokkal - promoter és terminátor szekvenciákkal - valamint adott esetben az 5'- és/vagy 3'-szakasz további kódoló és/vagy nem kódoló szekvenciáival funkcionális kapcsolatban tartalmazzák.

Ez esetben előnyös a promoter szekvencia és a hozzákapcsolódó kódoló DNS szekvencia közé egy "leader"-szekvenciát (vezér szekvenciát) beépíteni, amikor is a vezérszekvencia hosszát úgy választjuk meg, hogy a promoter és a találmány szerinti DNS szekvencia közti távolság a mindenkori aszociált strukturális gén expressziója számára optimális legyen.

Továbbá az is előnyös, ha a bejuttatandó DNS molekula egy olyan szekvenciát tartalmaz, vagy pedig 5'-terminális szakaszában egy olyan szekvenciával van összekapcsolva, amely a növényi sejtben egy működő N-terminális szignál-peptidet kódol. Ezenkívül további szekvencia-részleteket is tartalmazhat a DNS molekula, amelyek olyan peptid fragmentumokat kódolnak, amelyek összességükben a vakuólába való felvétel hatékonyságának növeléséhez járulnak hozzá, mint például a K. Matsuoka és K. Nakamura által a sporamin N-terminális szakaszában felfedezett pro-peptid fragmentum [K. Matsuoka és K. Nakamura (1991)].

A találmány szerinti eljárásban való alkalmazás céljára elsősorban mindazok a strukturális gének alkalmasak, amelyek a transzformált növényi sejteknél, valamint az ezekből kialakult szöveteknél és főként a növényeknél védőhatást fejtenek ki, így például kórokozók (például fitopatogén gombák, baktériumok, vírusok, stb.) ellen megnövekedett rezisztenciát; kemikáliákkal [például gyomirtókkal szemben (ilyenek például a következők: triazinok, szulfonil-karbamidok, imidazolinonok, triazol-pirimidinek, bialafosz, glifozát, stb.) rovarirtókkal

vagy más biocidekkel szemben/ szembeni rezisztenciát; káros környezeti hatásokkal (például hőséggel, hideggel, széllel, kedvezőtlen talaj-viszonyokkal, csapadékkal, szárazsággal, stb.) szembeni rezisztenciát.

A találmány értelmében különösen kiemelkedően fontosak azok a strukturális gének, amelyek a növényi kórokozók és paraziták leküzdésével kapcsolatosak.

Rovarokkal szembeni rezisztenciát például egy gén révén úgy lehet átvinni, ha az egy olyan polipeptidet kódol, amely a rovarokra és/vagy ezek lárváira toxikus, ilyen például a *Bacillus thuringiensis*-ből származó kristályos protein.

A proteinek egy második csoportját képezik a rovarok elleni rezisztenciát közvetítő proteáz inhibitorok. A proteáz inhibitorok a növényi tartalék-képző strukturák szokásos alkotórészét képezik, tehát rendszerint a vakuólákban, illetve a "protein bodies"-ban helyezkednek el. Ki lehet mutatni, hogy egy szójababból izolált és tisztított Bowman-Birk proteáz inhibitor a *Tenebrio* lárvák bélproteázait gátolja [Birk és mtsai (1963)]. A tehénborsóból származó tripszin inhibitort kódoló gént Hilder és mtsai (1987) írták le.

A találmány keretében tetszés szerinti proteáz inhibitorok alkalmazhatók származéuktól függetlenül (például ha nem növényi eredetűek, vagy ha tisztán szintetikus forrásból származnak), ha ezeket a növényi sejtben működőképes, egy N-terminális szignál-peptiddel és a találmány szerinti C-terminális "targeting"-szekvenciával mesterségesen összekapcsoljuk. Az eljárás eredménye az lesz, hogy az így módosított proteáz

inhibitorok célzottan a vakuólába kerülnek, ahol optimális mértékben elraktározódhatnak.

Egy alkalmas vektorban egy protáz inhibitort kódoló gént bevihetünk valamilyen növényi promóter - főként konstitutív promóter, ilyen például a CaMV 35S promóter - szabályozása alá. A gént, például a szójabab eredetű Bowman-Birk proteáz inhibitort kódoló szekvenciát, a cDNS klónozási módszer segítségével kaphatjuk meg. Egy protáz inhibitor előállításának további lehetőségét a szintetikus előállítás jelenti, amennyiben kevesebb, mint 100 aminosavból áll, mint amilyen a Lima-bab eredetű tripszin inhibitor. A kódoló szekvenciát az aminosav szekvencia visszafordítása révén megállapíthatjuk. Pótlólag mindkét végére olyan restrikciós hasítási helyeket építhetünk be, amelyek a mindenkori kívánt vektorhoz alkalmazkodnak. A szintetikus gént úgy állítjuk elő, hogy 30-60 bázispárból álló átfedő oligonukleotid fragmentumokat szintetizálunk, először ezeket kinázzal reagáltatjuk, majd egymással összekapcsoljuk [Maniatis és mtsai (1982)], végül egy megfelelő vektorba beklónozzuk. Ezután DNS szekvenálás segítségével egy olyan klónt azonosítunk, amely az inszertumot korrekt irányítottsággal tartalmazza. A protoplasztokba való bevezetéshez izolált plazmid-DNS-t használunk.

Ebben az összefüggésben említésre méltóak a hidrolitikus enzimek is, amelyek a növényi kórokozók sejtfalának lebontását vagy maguk végzik el, vagy pedig ezt más anyagokkal kapcsolódva, mint szinergisták legalábbis elősegítik.

A rovarok többségének például kutikula vázuk van, amelyben a kitinből álló lemezesen felépített micellák bizonyos alapanyagba vannak beágyazva. Számos növény-kórokozó gomba is tartalmaz kitint, hifa- és spóra-strukturáik alkotórészeként. Ilyenek például a Basidiomyceták (üszöggombák és rozsdagombák), az Ascomyceták és a Fungi Imperfecti (beleértve a következőket: *Alternaria* és *Bipolaris*, *Exerophilum turcicum*, *Colletotricum*, *Gleocercospora* és *Cercospora*). A kitináz bizonyos kórokozóknál a micélium növekedését *in vitro* gátolni képes. Egy növényi szerv vagy szövet, mely a kitinázt kons titutive vagy pedig egy kórokozó behatolására adott válaszként kifejezni képes, nagyszámu különböző gomba támadásától tudná megvédeni magát.

A növényekben természetesen jelenlévő endogén kitinázok vagy extracellulárisan fordulnak elő (savanyú kitinázok) vagy a vakuólán belül (bázikus kitinázok), így a találmány szerint két alternatív eljárási mód képzelhető el.

Az egyik szerint a savanyú kitináz géneket, amelyek C-terminális végéről a vakuólába való bejuttatásért felelős szekvencia hiányzik, a találmány szerinti DNS szekvencia segítségével úgy lehet módosítani, hogy a géntermékeket célzottan a vakuóla vegye fel, hogy az ott természetesen jelenlévő endogén bázikus kitinázok hatását a behatoló patogének ellen támogassák.

A másik változat abból áll, hogy egy természetesen vakuolárisan előforduló bázikus kitináz génből géntechnológiai eljárással a C-terminális részt a nyílt levolvasási keretből

eltávolítjuk, vagy pedig legalább inaktiváljuk, például egy stop kodonnak közvetlenül a C-terminális szakasz elé való beiktatásával. Ennek eredményeként a géntermék az intercelluláris térbe szecernálódik, ahol a behatoló kórokozóval közvetlen érintkezésbe kerülhet.

A jelen találmány egy további szempont szerint tehát olyan rekombináns DNS molekulákra is vonatkozik, amelyek egy természetesen vakuolárisan előforduló strukturális gént a növényi sejtekben működő expressziós szignálokkal funkcionális kapcsolatban tartalmazznak, de a génben természetesen jelenlévő 3'-terminális "targeting"-szekvencia deletált vagy pedig más módon inaktivált. Ezek a szerkezetek egy növény-gazda transzformálása esetén olyan expressziós terméket eredményeznek, amely már nem tartalmazza a funkcionális C-terminális szignál-szekvenciát és így a növény az extracelluláris térbe szecernálódik.

Különösen előnyös az olyan rekombináns DNS molekula, amely egy bázikus kitináz gént a növényi sejtekben aktív expressziós szignálokkal funkcionális kapcsolatban tartalmaz, s a génben természetesen jelenlévő 3'-terminális "targeting"-szekvenciája deletált vagy másként inaktivált és így egy növény-gazda transzformációja esetén egy olyan expressziós terméket eredményez, amely már nem tartalmaz funkcionális C-terminális szignál-szekvenciát és így a növény extracelluláris terébe választódik ki.

Egy másik enzim, amely a növény kórokozók elleni védekező mechanizmusában valószínűleg központi szerepet ját-

szik, a β -1,3-glükanáz, amelynek a találmány szerinti DNS szekvenciával kombináltan történő alkalmazását ezért ugyancsak előnybe helyezzük a találmány keretében.

Tehát előnybe helyezünk egy olyan rekombináns DNS molekulát, amely egy bázikus glükanáz gént a növényi sejtekben aktív expressziós szignálokkal funkcionális kapcsolatban tartalmaz, s a génben természetesen előforduló 3'-terminális "targeting"-szekvenciája deletált vagy más módon inaktivált és így egy növény-gazda transzformációja esetén olyan expressziós terméket szolgáltat, amely már nem tartalmaz funkcionális C-terminális szignál-szekvenciát és így a növény extracelluláris terébe szecernálódik.

A találmány további tárgyát képezi a találmány szerinti "targeting"-szekvenciának az un. litikus peptidekkel ("lytic peptides") való összekapcsolása. Ezek anti-patogén aktivitású természetes vagy szintetikus peptidek, amelyek képesek a kórokozók sejtmembránját áttörni, lizálni vagy más módon károsítani. A találmány szerint felhasználásra kerülő ilyen litikus peptideknek úgy állati (beleértve a rovarokat), mint növényi és mikrobiális forrásokból származó képviselői ismertek és például ilyenek a következők: az emlősökből származó defenzin, cerkopin, tionin, mellitin, a rovarokból származó defenzin, magainin, attacin, dipterin, szapecin, caerulin, xenopszin, valamint ezek hibridjei. A különböző litikus peptidek aminosav szekvenciáit a következő publikációk tartalmazzák: a WO 89/11291; WO 86/04356; WO 88/05826 számú nemzetközi szabadalmi bejelentés, az US 4,810,777 számú amerikai egyesült

államokbeli szabadalmi leírás, a WO 89/04371 számon közzétett nemzetközi szabadalmi bejelentés, valamint Bohlmann és mtsai (1988), Selsted és Hartwig (1987) és Terry és mtsai (1988) közleményei.

Litikus peptidek alatt a legszélesebb értelemben olyan vegyületek is értendők, amelyek a sejtmembrán penetrációjára, lizisére vagy károsítására enzimatis aktivitásuk révén képesek. Ilyen például a lizozim és a foszfolipázok.

A találmány szempontjából kiváltképpen előnyös a hidrolitikus és litikus peptidek kombinált expressziója, amelyet a vakuólába vagy adott esetben az extracelluláris térbe való célirányos bejutásuk követ. Ebből következően az expresszió-
nak és az exogén alkalmazásnak váltakozó felhasználása képzelhető el, amikor is ez utóbbi célú alkalmazásnál főleg a litikus peptidek jönnek számításba a szokásosan erre a célra használt segéd- és/vagy adalék-anyagokkal együtt.

A találmány szerinti DNS szekvencia ideális módon használható fel a kívánt és hasznos vegyületek termelésére növényi sejtekben vagy ugyanezekben, mint magasabban szervezett egységek - ilyenek a szövet, kallusz, szerv, embrió vagy egy egész növény - alkotórészeiben.

A jelen találmányban alkalmazott gének között vannak például olyanok is, amelyek levelekben, magokban, gumókban, gyökerekben, szárakban, stb. vagy a "protein bodies"-ban a tartalék- vagy raktározott anyagok megnövekedett képződéséhez vezetnek. Kívánt értékes anyagoknak számítanak például a proteinek, szénhidrátok, aminosavak, vitaminok, alkaloidok, flavi-

nok, szag- és szín-anyagok, zsírok, stb., melyeket a transzgenikus növények képesek termelni.

Olyan strukturális gének is asszociálhatók a találmány szerinti DNS szekvenciával, amelyek gyógyszerészetileg elfogadott hatóanyagokat, mint például hormonokat, immunmodulátorokat és más fiziológiailag hatásos anyagokat kódolnak.

A találmány keretében figyelembe vehető gének közé tehát ismert gének is tartozhatnak, ilyenek például a növény-specifikus gének, mint a kukoricából a zein gén, a zabból az avenin gén, a rizsből a glutelin gén, stb., az emlős-specifikus gének, mint az inzulin gén, a szomatosztatin gén, az interleukin gének, a t-PA gén (tissu plasminogen activator = szöveti plazminogén aktivátor), stb., vagy pedig a mikrobiális eredetű gének, mint az NPT II (neomicin-foszfotranszferáz II) gén, stb., továbbá szintetikus gének, mint az inzulin gén, stb. A fent említettek nem korlátozzák a figyelembe vehető ismert gének körét.

A hasznos és értékes tulajdonságot kódoló természetben előforduló strukturális géneken kívül a találmány szerint olyan géneket is alkalmazhatunk, amelyeket előzőleg kémiai vagy géntechnológiai módszerek segítségével módosítottunk.

A találmány - szélesebb értelmezés szerint - olyan géneket is magába foglal, amelyeknek az előállítása teljes kémiai szintézissel történt. A találmány szerint alkalmazható gének vagy DNS szekvenciák esetén a jelen találmányban megfogalmazott definíciók szerint számításba jönnek mind a homológ, mind a heterológ gének vagy DNS-ek, valamint a szintetikus gének vagy DNS-ek. Példaként említettük az inzulin gént, mint szintetikus gént.

A találmány értelmében alkalmazható DNS szekvenciákat kizárólag genomiális DNS-ből, cDNS eredetű DNS-ből, illetve szintetikus DNS-ből szerkeszthetjük meg. Egy másik lehetőség olyan hibrid DNS szekvencia szerkesztésében rejlik, amely úgy cDNS-ből, mint genomiális DNS-ből is és/vagy szintetikus DNS-ből is áll.

Ebben az esetben a cDNS ugyanabból a génből származhat, mint a genomiális DNS, vagy pedig mind a cDNS, mind a genomiális DNS különböző génekből származhat. Azonban mindegyik esetben úgy a genomiális DNS és/vagy a cDNS egyenként ugyanazon vagy különböző génekből állítható elő.

Ha a DNS szekvencia nem csupán egy gén részeit tartalmazza, úgy ezek a gének vagy egy ugyanazon szervezetből vagy több olyan szervezetből származhatnak, amelyek különböző törzsekhez vagy ugyanezek változataihoz tartoznak, vagy ugyanazon nem különböző fajaihoz tartoznak vagy pedig olyan szervezetekből származnak, amelyek ugyanazon vagy egy másik taxonómiai egységnek (körnek) több neméhez tartoznak.

Az említett strukturális gének növényi sejtekben való kifejeződésének a biztosítása érdekében előnyös, ha a kódoló gén-szekvenciákat először növényi sejtekben működőképes expressziós szekvenciákkal kapcsoljuk össze mesterségesen. A találmány szerinti hibrid génszerkezetek tehát a találmány szerinti DNS szekvenciákon kívül egy vagy több strukturális gént tartalmaznak, továbbá ezekkel funkcióképes kapcsolatban expressziós szignálokat, amelyek promoter és terminátor szek-

venciákat tartalmaznak, valamint a 3' és 5' nem-transzlatált szakaszok további szabályozó szekvenciáit is magukba foglalják.

Minden olyan promotert és minden olyan terminátort, amely egy kódoló DNS szekvencia (strukturális gén) expressziójának indukciójára képes, felhasználhatunk hibrid génszekvencia alkotórésze gyanánt. Különösen alkalmasak azok az expressziós szignálok, amelyek növények vagy növényi vírusok génjeiből származnak. Alkalmasak például a Cauliflower mozaik vírus (CaMV) gén promoterei és terminátorai vagy pedig az olyan homológ DNS szekvenciák, amelyek még az említett expressziós szignálok jellemző tulajdonságaival rendelkeznek. Hasonlóképpen alkalmasak a bakteriális expressziós szignálok, főként a nopalin-szintáz gén (nos) vagy az *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plazmidjaiból származó oktopin-szintáz gén (ocs) expressziós szignálja.

A találmány szempontjából előnyös a CaMV genom 35S és 19S expressziós szignálja vagy az ezekkel homológ szignálok, amelyeket a Maniatis és mtsai által leírt (1982) molekuláris biológiai módszerekkel az említett genomból izolálhatunk, s a kódoló szekvenciához kapcsolhatunk.

A találmány értelmében a 35S és 19S expressziós szignálokkal homológ szignálok alatt olyan szekvenciákat értünk, amelyek csekély szekvencia különbségek ellenére a kiindulási szekvenciával lényegében homológok és amelyek ezekkel azonos funkciót töltenek be.

A találmány szerint a 35S transzkripció szabályozó

szekvencia kiindulási anyagául például a CaMV "S" törzs ScaI fragmentumát használhatjuk, amely a géntérkép szerint a 6808-7632 számú nukleotidokat foglalja magába [G. Frank és mtsai (1980)].

A 19S promoter és az 5' nem-transzlatált szakasz a géntérképen egy genom-fragmentumon található, a PstI hely (5386-os pozíció) és a HindIII hely (5850-es pozíció) között [Hohn és mtsai (1982)]. A megfelelő terminátor és 3' nem-transzlatált szakasz a CaMV genom egy EcoRV/BglII fragmentumán, a 7342-es és 7643-as pozíció között terül el.

A találmány szerint előnyösek még a CaMV CM 1841 törzs expressziós szignáljai, amelyeknek a teljes nukleotid szekvenciáját R.C.Gardner és mtsai (1981) írták le.

A növényi promoterek további olyan hatékony képviselője nyerhet alkalmazást, amely intenzíven termelő növényi promoter. Az ilyen fajta promoterek, amennyiben ezek egy kívánt génterméket kódoló génszekvenciához funkcionálisan kapcsolódnak, meg tudják indítani az említett génszekvencia expresszióját.

A találmányban felhasznált intenzíven termelő növényi promoterek közé tartozik a szójababból származó ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz kis alegységének (small subunit; ss) promotere, valamint a klorofill-a/b kötőprotein promotere. Ismeretes, hogy ezt a két promotert eukarióta növényi sejtekben a fény indukálja [lásd például: A.Cashmore: Genetic Engineering of Plants, an Agricultural Perspective (1983)].

A találmány tehát olyan rekombináns DNS molekulákkal is foglalkozik, amelyeknek kiméra genetikai szerkezetük van, s

ebben a találmány szerinti DNS szekvencia egy kifejezhető DNS-sel, a növényi sejtekben működő expressziós szignálokkal, valamint adott esetben az 5'- és/vagy 3'-szakasz további átírt és/vagy nem átírt szekvenciáival funkcionális kapcsolatban van, s így egy növényi gazda transzformálása esetén az expressziós termékeknek célzottan a növényi vakuólába való felvételére kerül sor.

Különösen előnyösek az olyan kiméra genetikus szerkezetet tartalmazó rekombináns DNS molekulák, amelyekben a találmány szerinti DNS szekvencia egy olyan strukturális génnel van mesterségesen asszociálva, amely a transzformált növényi sejteknek, valamint az ezekből kialakult szöveteknek és főképpen növényeknek a kórokozókkal, kemikáliákkal és a káros környezeti hatásokkal szemben védő hatást kölcsönöz.

Nagymértékben előnybe helyezzük a találmány értelmében azokat a kiméra genetikus szerkezetet tartalmazó rekombináns DNS molekulákat, amelyekben a találmány szerinti DNS szekvencia olyan strukturális génnel van mesterségesen asszociálva, amely növényi sejtekben kitinázt, főként savanyú kitinázt, vagy glükánázt, főként savanyú glükánázt fejez ki.

Vonatkozik még a találmány azon kiméra genetikus szerkezetet tartalmazó rekombináns DNS molekulákra, amelyekben a találmány szerinti DNS szekvencia olyan strukturális génnel van mesterségesen asszociálva, amely a transzformált növényi sejtben - mely vagy szövetből vagy szervből vagy kalluszból vagy embrióból vagy az egész növényből álló magasabban szervezett egység alkotórésze lehet - való kifejeződésekor a kí-

vánt és hasznos vegyületeknek a növényi vakuóla által történő felvételét teszi lehetővé.

Ugyancsak előnyösek az olyan kiméra genetikus szerkezetet tartalmazó rekombináns DNS molekulák, amelyek egy természetben vakuolárisan előforduló protein molekulát kódoló gént tartalmaznak, előnyösen azonban egy bázikus kitináz gént és különösen előnyösen a dohány vagy uborka növényből származó egy bázikus kitináz gént, s amelyekben e géneket úgy módosítottuk, hogy az az extracelluláris térbe szecernálódjék. Ezt úgy tudjuk elérni, hogy az említett génekben, különösen azonban a kitináz génekben természetesen meglévő C-terminális szakaszt, amely a vakuólába való bejuttatásért felelős DNS szekvenciákat tartalmazza, géntechnológiai eljárásokkal eltávolítjuk, illetve inaktiváljuk, például egy stop kodonnak közvetlenül a C-terminális szakasz elé való beiktatásával.

A kiméra génszerkezetekben alkalmazott további szabályozó DNS szekvenciák közé tartoznak például az olyan szekvenciák, amelyek a növényi szövetekben egy asszociált DNS szekvencia transzkripcióját képesek szabályozni indukció vagy represszió révén.

Például van néhány növényi gén, amelyekről tudjuk, hogy külső és belső faktorok, mint növényi hormonok, hő-sokk, kemikáliák, oxigén-hiány, fény, stressz, stb. indukálják.

A növényi hormonok által történő génszabályozásra példaként megemlítjük az abszcisszin-savat (ABS), amelyről tudjuk, hogy gyapokban a késői embrionális fázis folyamán mRNS-ek feles-

legben való keletkezését indukálja. További példát szolgáltat a gibberellin-sav (GA3), amely a ricinus magokban a malátaszintáz átíratokat, valamint az árpa aleuron rétegeiben az α -amiláz izoenzimeket indukálja.

A bab leveleiben az etilén stressz-hormonnal való kezelés jelentősen növeli a glükánáz és kitináz aktivitást. A kitináz-nál ezt az indukciós hatást a kitináz gén promotere vezérli, s ezt riporter-gén kísérletekben, bab (*Phaseolus vulgaris*) eredetű kitináz gén egy promotere használatával ki lehetett mutatni.

A szójabab hősokra érzékeny protein génjének a szabályozását részletesen vizsgálták. A növény több órás 40°C-on való kezelése ún. hősokk-proteinek de novo szintézisét eredményezte. Időközben számos ilyen gént izoláltak és szabályozásukat részletesen analizálták. E gének expressziója elsősorban a transzkripció szintjén van szabályozva. Például, ha a hps70 gén promoterét az NPT II génnel (neomicin-foszfo-transzferáz II) fuzionáljuk, az ilyen módon kapott kiméra gént hősokkal lehet indukálni [Spena és mtsai (1985)].

A növényekben indukálható gének egy másik csoportjába tartoznak a fénnel szabályozott gének. Ilyen a ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz (RUBISCO) kis alegységének mag által kódolt génje. Morelli és mtsai (1985) kimutatták, hogy a borsóból származó egy RUBISCO gén 5' végével határos szekvenciája képes átvinni a fény-indukálhatóságot egy riporter-génre, amennyiben ezek kiméra formában össze vannak kapcsolva. Ezt a megfigyelést más fénnel indukálható génekre is ki lehet

terjeszteni, mint például a kloforill a/b-kötőproteinre.

A kukorica alkohol-dehidrogenáz génjeit (adh gének) behatóan vizsgálták. Az adh1-s gént kukoricából izolálták és kimutatták, hogy az 5' véggel határos DNS egy része kiméra riportergén (például: kloramfenikol-acetil-transzferáz = CAT) expresszióját képes indukálni, ha az átmeneti módon transzformált szövetet anaerob körülmények között tartják [Howard és mtsai (1987)]:

A szabályozható DNS szekvenciák további csoportját a kémiaiilag szabályozható szekvenciák alkotják, amelyek például a dohány PR-protein ("pathogenesis related protein") génjei közt fordulnak elő és kémiai regulátorok segítségével indukálhatók.

Az előzőekben említett szabályozható DNS szekvenciák akár természetes, akár szintetikus eredetűek lehetnek, de állhatnak természetes és szintetikus DNS szekvenciák keverékéből is.

Ugyancsak előnyös, ha a kifejezhető DNS, főleg pedig a bejuttatandó strukturális gén egy olyan szekvenciát tartalmaz, vagy pedig 5'-terminális szakaszában egy olyan szekvenciával van összekapcsolva, amely a növényi sejtben működőképes egy N-terminális szignál-peptidet kódol. Itt transzport-szignálról van szó, amely azoknak a proteineknek az N-terminális végén található, amelyeknek a transzportja az endomembrán rendszeren keresztül megy végbe. Ez a szignál-szekvencia gondoskodik arról, hogy az említett protein először az en-

doplazmatikus retikulumba jusson, ahol a szignál-peptid -mihelyt feladatát betöltötte - a prekursor proteinről proteolitikusan lehasad. Speciális funkciójának megfelelően a szignál-peptidek ezen szekvencia típusa az evolúció folyamán minden élő sejtben nagymértékben állandó maradt, függetlenül attól, hogy baktériumról, gombáról, állatról vagy növényről van szó.

Ennek értelmében a DNS molekulában még további szekvencia részek vannak, amelyek azokat a peptid fragmentumokat kódolják, amelyek összességükben a vakuólába való felvétel javításához járulnak hozzá, ilyen például a K. Matsuoka és K. Nakamura által a sporamin N-terminális szakaszában felfedezett propeptid fragmentum [K. Matsuoka és K. Nakamura (1991)].

A találmány további tárgyát képezik tehát az olyan kimerá genetikus szerkezetek, amelyek egy strukturális génnel vagy egyéb kifejezhető DNS szekvenciákkal funkcionális kapcsolatban lévő találmány szerinti "targeting"-szekvencián kívül további szabályozó DNS szekvencia szakaszokat tartalmaznak, amelyek például a génkifejeződés célzott indukcióját vagy represszióját teszik lehetővé.

A különböző szekvencia szakaszok ismert módszerek segítségével teljes kódoló szekvenciához kapcsolhatók. Alkalmass módszer például a homológ szakaszokat tartalmazó DNS szekvenciák in vivo rekombinációja, valamint a restrikciós fragmentumok in vitro összekapcsolása.

Klónozó vektorokként általában replikációs és szabá-

lyozó szekvenciákkal ellátott plazmid- vagy vírus- (bakteriofág-) vektorokat alkalmazunk, amelyek a gazdasejttel kompatibilis fajokból származnak.

A klónozó vektor rendszerint egy replikációs kezdőpontot tartalmaz, főleg olyan replikációs kezdőpontot, amely *E.coli*-ban, *Agrobacterium*-ban vagy mindkettőben működőképes, ezenkívül olyan speciális géneket, amelyek a transzformált gazdasejtben fenotípusos szelekciós ismertetőjegyeket biztosítanak, kiváltva képpen antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát vagy meghatározott gyomirtókkal szembeni rezisztenciát. A transzformált vektorokat e fenotípusos markerek alapján - a gazdasejt transzformálása után - szelektálhatjuk.

A találmányban felhasználható szelektálható fenotípusos markerek közé tartozik például az ampicillin, tetraciklin, higromicin, kanamicin, metotrexát, G418 és neomicin elleni rezisztencia. A felsorolt példák nem korlátozzák a találmány tárgyát.

A találmány keretében prokarióták jönnek számításba gazdasejtek gyanánt, beleértve a bakteriális gazdákat, ilyenek például az *A.tumefaciens*, *E.coli*, *S.typhimurium* és a *Serratia marcescens*, valamint a Cyanobaktériumok. Eukarióta gazdasejtek is használhatók a találmány szerint, például az élesztők, micéliumképző gombák és növényi sejtek.

A találmány szerinti hibrid génszerkezetek bevezetése egy alkalmas klónozó vektorba standard módszerek segítségével történik, ahogyan ezt például Maniatis és mtsai (1982) leírták.

Ekkor rendszerint a vektort és a bevezetendő DNS szekvenciát először alkalmas restrikciós enzimekkel elhasítjuk. Alkalmas restrikciós enzimek például azok, amelyek tompa végű fragmentumokat szolgáltatnak, ilyenek például a SmaI, HpaI és az EcoRV, vagy azok az enzimek, amelyek ragadós (kohezív) végeket hoznak létre, mint például az EcoRI, SacI és a BamHI.

Mind a tompa végű, mind a ragadós végű fragmentumokat megfelelő DNS ligázokkal újra össze lehet kapcsolni, egységes, állandó DNS molekulává.

A kinyúló, ragadós végű DNS fragmentumok tompa végét úgy lehet helyreállítani, hogy az E.coli DNS polimeráz Klenow-fragmentje segítségével a hiányzó részeket a megfelelő komplementer nukleotidokkal betöltjük.

Másrészt mesterségesen is elő lehet állítani kohezív végeket például úgy, hogy komplementer homopolimer farkakat illesztünk egy kívánt DNS szekvencia vagy az elhasított vektor molekula végére egy terminális dezoxi-nukleotidil-transzferáz használatával, vagy pedig úgy, hogy restrikciós hasítási helyet tartalmazó szintetikus oligonukleotid szekvenciákat (linker) illesztünk a végére, majd a megfelelő enzimmel hasítunk.

A találmány keretében a kitináz mutánsok szerkesztésénél az éppen alkalmazott kitináz klónok különböző részeit kapcsoljuk össze. Hogy ezt a célt elérjük, ezeknek a részeknek kompatibiliseknek kell lenniük, azaz megfelelő restrikciós hasítási helyeket kell a különböző szekvenciákba bevezetni. A jelen találmány egy speciális megvalósítási formájában előnyösen az

alábbiakban felsorolt restrikciós hasítási helyeket alkalmaz-
zuk, amelyek mind azonos ragadós végeket hoznak létre:

BamHI [G/GATCC]

BclI [T/GATCA]

BglII [A/GATCT]

A leolvasási keretet előnyösen minden esetben úgy vá-
lasztjuk meg, hogy a GAT az aszparagin kodonjaként működjék.

A klónozó vektorokat és az ezekkel a vektorokkal transz-
formált gazdasejteket rendszerint arra használjuk, hogy a bekló-
nozott szerkezet másolatszámát megnöveljük. Megnövelt másolat-
számmal lehetségessé válik, hogy a hibrid génszerkezetet hordo-
zó vektort izoláljuk és például hogy előkészítsük a kiméra gén-
szerkezetnek a növényi sejtbe való bejuttatását.

Az eljárás egy másik lépésében ezeket a plazmidokat arra
használjuk, hogy a kívánt génterméket kódoló strukturális
géneket vagy a szabályozó funkciót betöltő nem kódoló DNS
szekvenciákat a növényi sejtekbe bejuttassuk és adott esetben
a növényi genomba integráljuk.

A jelen találmány egy további tárgyát képezi az olyan
növényi befogadó sejtek előállítása, amelyek az említett struk-
turgént vagy az egyéb kívánatos géneket, illetve gén-fragmen-
tumokat vagy az egyéb hasznos DNS szekvenciákat genomjaikba
beépítve tartalmazzák.

A kiméra genetikus szerkezeteket előnyösen növényi
protoplasztokba vezetjük be ismert gén-transzfer eljárások
segítségével.

A DNS-nek növényi sejtekbe való bevitelére időközben egy sor nagyon hatékony eljárás került használatba, amelyek géntranszfer vektorokon vagy direkt gén-transzfer eljárásokon alapulnak.

Az egyik lehetőség például abból áll, hogy növényi sejteket vírusokkal vagy *Agrobacterium*mal hoznak össze. Ezt úgy lehet kivitelezni, hogy az érzékeny növényi sejteket megfertőzik, vagy a növényi sejtekből előállított protoplasztokat ezekkel együtt tenyésztik. A találmány szerint a Cauliflower mozaik vírust (CaMV) vektorként is fel lehet használni a találmány szerinti kiméra genetikus szerkezeteknek a növénybe való bejuttatására. Ekkor a CaMV teljes virális DNS genomját egy bakteriális szülőplazmidba integráljuk, s ez olyan rekombináns DNS molekulát képez, amely baktériumokban szaporodni képes. A klónozás elvégzése után a rekombináns plazmidot restrikciós enzimek segítségével, vagy véletlenszerűen vagy teljesen specifikusan a rekombináns plazmid vírus részén belüli nem esszenciális helyeken hasítjuk, például azon a génen belül, amely a vírus levéltetvek révén történő átvitelét kódolja és a hibrid génszerkezetet ezen hasítási helyre klónozzuk be.

Egy kis oligonukleotid, egy ún. linker, amely egyetlen speciális restrikciós hasítási helyet tartalmaz, ugyancsak integrálható. Az így módosított rekombináns plazmidot újra klónozzuk, majd a hibrid génszerkezetnek egy csak egyszer előforduló restrikciós helyre való beépítésével tovább módosítjuk.

Ezután a rekombináns plazmid módosított virális alkotórészét a bakteriális szülőplazmidból kihasítjuk és felhasznál-

hatjuk a növényi sejtek vagy az egész növény beoltására.

A kiméra génszerkezetnek a sejtbe való bevitelét egy más módszerrel úgy oldjuk meg, hogy a növényi sejtet az említett génszerkezettel transzformált *Agrobacterium tumefaciens*-szel és/vagy *Agrobacterium rhizogenes*-szel megfertőzzük. A transzgenikus növényi sejteket ezután a szakemberek részéről ismert megfelelő tenyésztési körülmények között tenyésztjük, hogy azokból sarjhajtások és gyökerek képződjenek és végül az egész növény kifejlődjék.

További lehetőséget jelent a növényi anyag transzformálására, ha keverten fertőzzük meg mind *Agrobacterium rhizogenes*-szel, mind transzformált *Agrobacterium tumefaciens*-szel, ahogyan ezt Petit és mtsai (1986) a karották transzformációjánál leírták. A keverék-arányt úgy kell egymáshoz igazítani, hogy az *A. rhizogenes*-szel való transzformálás következtében kialakult gyökérke-telepek az *A. tumefaciens* Ti-plazmidjaiból is nagy részt tartalmazzanak. Ezt például úgy lehet elérni, ha az *A. rhizogenes*-t és az *A. tumefaciens*-t 1:1-1:100 keverék arányban, előnyösen azonban 1:10 keverék arányban, ismert módon együttesen alkalmazzuk a növényi anyagra. A transzgenikus növényeket ezután a szakemberek előtt ismert alkalmas tenyésztési feltételek mellett tenyésztjük úgy, hogy sarjhajtások és gyökér képződjön és végül az egész növény kifejlődjék. A két *Agrobacterium* faj elegyítését előnyösen röviddel a transzformálandó növényi anyag tulajdonképpeni beoltása előtt végezzük el.

A találmány szerinti kiméra génszerkezet például az

Agrobacterium tumefaciens Ti-plazmidja vagy az *Agrobacterium rhizogenes* Ri-plazmidja révén vihető át az alkalmas növényi sejtekbe. A Ti-plazmid, illetve a Ri-plazmid az *Agrobacterium*-mal való fertőzés révén jut be a növénybe, ahol a növényi genomba stabilan integrálódnak.

Úgy a Ti-plazmidok, mint a Ri-plazmidok két olyan szakaszt tartalmaznak, amelyek a transzformált sejtek előállításához lényegesek. Ezek közül az egyik, a transzfer-DNS (T-DNS) szakasz, amikor a növényre kerül, tumor indukciót idéz elő. A másik, a virulenciát adó (vir) szakasz, csak a tumorok kifejlődése szempontjából lényeges és nem a fenntartásuk miatt.

A transzfer-DNS szakasz méreteit a kiméra génszerkezet beépítésével meg lehet növelni anélkül, hogy átvivő képessége károsodna. A tumort okozó gének eltávolítása után és egy szelekciós marker beépítése által a módosított Ti-, illetve Ri-plazmidot mint vektort lehet használni a találmány szerinti gén-szerkezeteknek egy megfelelő növényi sejtbe való átvitelére.

A vir-szakasz teszi lehetővé az *Agrobacterium* T-DNS szakaszának transzferjét a növényi sejt genomjára, függetlenül attól, hogy a T-DNS szakasz és a vir-szakasz ugyanazon a vektoron vagy ugyanazon *Agrobacterium* sejten belül, különböző vektorokon található. Egy kromoszómán lévő vir-szakasz éppúgy indukálja a T-DNS transzferjét egy vektorról egy növényi sejtbe.

A találmány keretében tehát előnyösen alkalmazunk egy rendszert ahhoz, hogy az *Agrobacterium*ból a T-DNS szakaszt

növényi sejtekbe vigyük át, amikor is a vir-szakasz és a T-DNS szakasz különböző vektorokon helyezkedik el. Az ilyen rendszer "biner vektor rendszer" néven ismert és a T-DNS-t tartalmazó vektort ennek megfelelően "biner vektor" névvel jelöljük.

Minden T-DNS-t tartalmazó vektor, amely növényi sejtekre vihető át és lehetővé teszi a transzformált sejtek szelekcióját, alkalmas a találmányban való felhasználásra.

E találmány szerint különösen előnyös egy "shuttle" vektor (ingázó vektor), amely a kiméra genetikus szerkezetet a bal és jobb határ-szekvencia közé klónozva tartalmazza és amely mind *E.coli*-ban mind *A.tumefaciens*-ben stabilan képes replikálódni.

Időközben az ujonnan kifejlesztett transzformációs technikákkal *in vitro* elvben olyan növényi-fajok is transzformálhatók, amelyek nem természetes gazdanövényei az *Agrobacterium*-nak. Ilyenek például az egyszikű növények, főként a gabonafélék, valamint a különböző fűvek, amelyek nem természetes gazdák az *Agrobacterium* számára.

Az időközben megsokasodott adatok ugyanis arra mutatnak, hogy az egyszikűek is transzformálhatók *Agrobacterium*-mal, azaz új kísérleti szempontok alkalmazása esetén - amelyek most rendelkezésre állnak - a gabona és a fűfajták is hozzáférhetővé váltak a transzformáció számára [N.H. Grimsley és mtsai (1987)].

A találmány szerint előnybe helyezzük az ún. "levélkorong transzformáció"-t ("leaf disc transformation") *Agrobacterium* alkalmazásával [Horsch és mtsai (1985)]. Egy al-

alkalmas célnövény steril levélkorongját olyan *Agrobacterium* sejtekkel inkubáljuk, amelyek egy találmány szerinti kiméra génszerkezetet tartalmaznak, majd egy megfelelő táptalajba vagy táptalajra helyezzük. Különösen alkalmasak és ezért e találmányban előnybe helyezzük az LS táptalajokat, amelyeket agar hozzáadásával szilárdítunk meg és amelyeket egy vagy több szokásosan használt növényi növekedés-szabályozó szerrel egészítünk ki. A szereket főként az auxinok csoportjából választjuk ki, s ezek a következők lehetnek: α -naftil-ecetsav, pikloram, 2,4,5-triklór-fenoxi-ecetsav, 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, indol-3-vajsav, indol-3-tejsav, indol-3-borostyánkösav, indol-3-ecetsav, p-klór-fenoxi-ecetsav, továbbá a citokininek csoportjából, amelyek a következők lehetnek: kinetin, 6-benzil-adenin, 2-izo-pentenil-adenin és zeatin. Az auxinok és citokininek előnyös koncentrációi 0,1-10 mg/l tartományba esnek.

Többnapos inkubálás után, de előnyösen 2-3 napos inkubálás után, melyet 20-40°C között, előnyösen 25-35°C között és igen előnyösen 25°C hőmérsékleten és diffúz fény mellett végzünk, a levélkorongokat a sarjképzés indukálása céljából egy alkalmas táptalajra visszük át. A transzformált levelek szelekciójára különösen előnyös egy olyan LS táptalaj, amely auxint nem, hanem egy citokinint tartalmaz és egy szelektív anyagot. A tenyészeteket fény alatt tartjuk és megfelelő időközönként, de előnyösen hetenként friss táptalajra visszük át. A fejlődő morfogén struktúrákat (zöld sarjakat) kivágjuk és egy olyan táptalajban tenyésztjük tovább, amely a sarj meggyökerezését indukálja. A találmány keretében egy olyan LS

táptalajt tartunk előnyösnek, amely sem auxint, sem citokinint nem tartalmaz, de a transzformált növény-kezdemény szelekciójához szelektív anyaggal van kiegészítve.

A találmány értelmében az *Agrobacterium* közvetítette transzformálás mellett a találmány szerinti génszerkezeteknek a növényi anyagba való bejuttatása céljára direkt transzformációs eljárások is alkalmazhatók.

A genetikai anyagot, amelyet egy vektor tartalmaz, például tisztán fizikai eljárás segítségével is, direkt bevihetjük a növényi sejtbe, például mikroinjekció révén, finomra kihúzott mikropipetták használatával [Neuhaus és mtsai (1987)] vagy pedig úgy, hogy a sejtekbe olyan mikro-lövedéket lövünk be, amelybe bevittük a transzformáló DNS-t [„Microprojectile Bombardment”; Y. C. Wang és mtsai (1988)].

A genetikai anyagnak a növényi sejtbe való direkt átvitelére további lehetőséget jelent, ha a protoplasztokat plazmamembrán módosító eljárásokkal kezeljük, ilyen például a polietilén-glikolos kezelés, a hősokk kezelés vagy az elektroporáció, valamint ezen eljárások kombinációi [Shillito és mtsai (1985)].

Az elektroporációs technika abból áll, hogy növényi protoplasztokat a hibrid génszerkezeteket tartalmazó plazmidokkal együtt nagy térerősségű elektromos impulzusoknak tesszük ki. Ez a kezelés a biomembránok permeabilitásának reverzibilis megnövekedését idézi elő és így lehetővé válik a plazmid bejutása. Az elektroporációval kezelt növényi protoplasztok megújítják a sejtfalukat, osztódnak és kallusz-szövetet

képeznek. A transzformált növényi sejtek szelekcióját az előzőleg leírt fenotípusos markerek segítségével el lehet végezni.

A genetikai anyagnak növényi sejtekbe való direkt bevezetésére szolgáló egy további eljárást, mely tisztán kémiai eljárásokon alapul és a transzformálás nagyon hatékony és gyors keresztülvitelét teszi lehetővé, I. Negrutiu és mtsai (1987), valamint G. Goodall és mtsai (1990) írták le.

Növényi anyagok transzformálására ugyancsak alkalmas a direkt génátvitel ko-transzformáció révén [R.J. Schocher és mtsai (1986)].

A kotranszformáció egy olyan módszer, amely különböző DNS molekuláknak (nem szelektálható és szelektálható gén) a növényi genomba való egyidejű felvételén és integrálódásán alapul, amely ennél fogva a nem szelektálható génekkel transzformált sejtek észlelését lehetővé teszi.

A lehetséges transzformáló eljárások előbbi felsorolása nem igényli a teljességet és nem korlátozza semmiképpen a tárlalmány tárgyát.

Azokat a sejtklónokat, amelyek a hibrid génszerkezeteket genomjaikba beépítve tartalmazzák, a szokásos szelekciós, szűrő és kimutatási módszerekkel választjuk ki és transzgenikus növények regenerálására alkalmazzuk.

A tenyésztett protoplasztok egész növényé történő regenerálásának leírását lásd I. Potrykus és R.D. Shillito (1986) közleményében.

A regenerációs eljárások a különböző növényfajoknál különbözőek. Általában azonban a protoplasztokat az ismert

táptalajok valamelyikében osztódásra és sejtfal képzésre készítjük. Végül kallusz tenyészetek alakulnak ki, amelyek meghatározott hatóanyagokkal, például auxinokkal és citokininekkel, gyökér, illetve sarj képzésre indukálhatók.

Az így kapott növénykéket végül földbe ültethetjük és ugyanúgy, mint a normál magoncokat, tovább tenésztethetjük.

Az eredményes regenerálás elsősorban a tápközegtől, a genotípustól és a tenyészet előtörténetétől függ. Amennyiben ezt a három változót kielégítően szabályozzuk, úgy a regenerálódás teljes mértékben reprodukálható és ismételhető.

A regenerált transzgenikus növények, amelyek az előbbieken leírt hibrid génszerkezetnek egy, a növényi sejtben kifejezhető strukturgénjét a növényi genom integrált alkotórészeként tartalmazzák, vegetatív módon szaporíthatók, előnyösen steril morfogén struktúrák tenyésztete formájában.

Egy működőképes kifejezhető génnek a regenerált transzgenikus növények növényi genomjába való stabil integrációját az integrálódott gén mitotikus stabilitása alapján, valamint a meiózis folyamán tanúsított viselkedése - mint Mendel féle ismertetőjegy - alapján igazoljuk, továbbá Southern blot analízis [E.M. Southern (1975)] alkalmazásával.

A találmány szélesebb értelemben a transzgenikus növényi anyagokkal is foglalkozik, ilyenek például az olyan protoplasztok, sejtek, kalluszok, szövetek, szervek, magok, embriók, pollének, petesejtek, zigóták, stb., valamint kiváltképpen az egész termékeny növény, amelyeket az előzőekben leírt eljárás-

sokkal transzformáltunk és a találmány szerinti rekombináns DNS-t kifejezhető formában tartalmazzák, továbbá az említett transzgenikus növények előállítására szolgáló eljárások.

A növényi vakuólába célzottan bejuttatandó génterméket tartalmazó transzformált növényi anyag előállítását szolgáló eljárás lényegében a következőkkel jellemezhető:

- (a) egy alkalmas forrásból először izoláljuk a vakuólába célzott bejuttatásért felelős DNS szekvenciát, vagy ezt ismert eljárásokkal szintetizáljuk;
- (b) az említett DNS szekvenciát mesterségesen beépítjük egy tetszés szerinti, kifejezhető DNS szekvencia 3' végébe;
- (c) a kész szerkezetet beklónozzuk egy növényi expressziós vektorba, egy növényben aktív expressziós szignál szabályozása alá; és
- (d) az említett expressziós vektorral - ismert eljárások segítségével - növényi anyagot transzformálunk, amelyben a vektor kifejeződik.

Amennyiben a kifejezendő DNS nem olyan strukturális gén, amely már természetétől fogva egy N-terminális szignál-peptidet kódol, úgy előnyös, ha pótlólag egy ilyen szignál-peptiddel kódoló DNS szekvenciát mesterségesen beépítünk a kifejezendő DNS 5'-terminális szakaszába.

Ugyancsak magába foglalja a találmány (az extracelluláris térbe célzottan szecernálódó génterméket tartalmazó) transzformált növényi anyagok előállítására szolgáló eljárást, s ezen eljárás lényegében a következőkkel jellemezhető:

- (a) egy ilyen génterméket kódoló DNS szekvenciát izolálunk;
- (b) a megfelelő celluláris kompartmentumba való bejuttatásért felelős "targeting"-szekvenciát a C-terminális végről eltávolítjuk;
- (c) az említett deletált DNS szekvenciát egy alkalmas növényi expressziós vektorba vezetjük be; és
- (d) a kész szerkezettel növényi anyagot transzformálunk.

A találmány keretében előnybe helyezzük a transzgenikus növényeket, beleértve a szexuális és aszexuális úton keletkező utódgenerációkat, amelyek növényi anyagból - ezek lehetnek protoplasztok, sejtek, kallusok, szövetek, szervek, magok, embriók, pollének, petesejtek, zigóták, stb. - regenerálhatók és egy találmány szerinti rekombináns DNS molekulát tartalmaznak.

Ugyancsak előnybe helyezzük azokat a transzgenikus növényeket, beleértve a szexuális és aszexuális úton keletkezett utódgenerációkat, amelyeknél a vadtypusu növényvel szemben jelentősen megnövekedett a növényi vakuóla és/vagy az extracelluláris tér protein tartalma.

Különösen előnyösek az olyan transzgenikus növények, - szexuális és aszexuális szaporulatukat is beleértve - amelyekben a vadtypusu növényvel szemben jelentősen megnövekedett a növényi vakuóla kitináz tartalma.

Különösen előnyösek az olyan transzgenikus növények is, - szexuális és aszexuális szaporulatukat is beleértve - amelyekben a vadtypusu növényvel szemben jelentősen megnövekedett a növényi extracelluláris tér kitináz tartalma.

A transzgenikus növények aszexuális és/vagy szexuális úton keletkező szaporulatának fogalma alá esik a jelen találmány meghatározása szerint minden olyan mutáns és variáns is, amelyeket ismert eljárások segítségével, például sejtfúzióval vagy mutáns szelekcióval állíthatunk elő és amelyek még a transzformált kiindulási növény jellemző tulajdonságaival rendelkeznek, valamint minden, a transzformált növényi anyaggal keresztezett és fuzionált termék.

A találmány további tárgyát képezi a transzgenikus növények szaporítóanyaga.

Transzgenikus növényi szaporítóanyag alatt e találmány szerint minden tetszőleges növényi anyag értendő, amely szexuális vagy aszexuális úton, illetve in vivo vagy in vitro szaporodik. A találmány szerint különösen előnyösek elősorban a protoplasztok, sejtek, kalluszk, szövetek, szervek, magok, embriók, pollének, petesejtek, zigóták, valamint bármilyen más olyan szaporítóanyag, amelyet transzgenikus növényekből kaphatunk.

Növényi részek, mint például virágok, szárak, levelek, gyökerek, amelyek olyan transzgenikus növényektől vagy ezek utódaitól származnak, amelyeket előzőleg a találmány szerinti eljárással transzformáltunk és amelyek ezek szerint legalábbis részben transzgenikus sejtekből vannak felépítve, szintén a találmány tárgyát képezik.

A találmány szerinti eljárás minden növény, főként az Angiospermae és Gymnospermae rendszertani csoportba tartozó növény transzformálására alkalmas.

A Gymnospermae csoportból különösen előnyösek a Coniferae osztály növényei.

Az Angiospermae csoportból a lombos fákön és bokrokon kívül a következő növény-családok különösen előnyösek: Solanaceae, Cruciferae, Compositae, Liliaceae, Vitaceae, Chenopodiaceae, Rutaceae, Alliaceae, Amaryllidaceae, Asparagaceae, Orchidaceae, Palmae, Bromeliaceae, Rubiaceae, Theaceae, Musaceae, Malvaceae vagy Gramineae és a Leguminosae rend és mindenek előtt a Papilionaceae család. Előnybe helyezzük a Solanaceae, Cruciferae és Gramineae család képviselőit.

A találmány keretében a céltenyészetekhez számítjuk például azokat is, amelyeket a következő csoportból választunk ki: *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Gossypium*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hemerocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browallia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum*, *Ipomoea*, *Passiflora*, *Cyclamen*, *Malus*, *Prunus*, *Rosa*, *Rubus*, *Populus*, *Santalum*, *Allium*, *Lilium*, *Narcissus*, *Ananas*, *Arachis*, *Phaseolus* és *Pisum*.

A növények in vitro tenyésztésének a területén, de kiváltképpen a növény-regenerálás területén elért fejlődés alapján időközben lehetőségessé vált a Gramineae család képviselőinél is növényi protoplasztokból kiindulva a teljes növényt regenerálni. A Gramineáknál végzett eredményes regenerációs kísérletekre többek között az alábbi példákat találjuk: rizs protoplasztokkal Rhodes és mtsai (1988) és R.D. Shillito és mtsai (1989), *Dactylis glomerata* protoplasztokkal Horn és mtsai (1988) kísérleteztek.

E találmány keretében a következő növények is felhasználhatók: *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Bromus*, *Oryzae*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale* és *Setaria*.

A találmány további előnyös tárgyát képezik a Graminaceae csoporthoz tartozó transzgenikus növények, valamint ezek szexuális és aszexuális úton kapott utódai, amelyek növényi anyagból, azaz protoplasztokból, sejtből, kalluszból, szövetből, szervből, magból, embrióból, pollénből, petesejtből, zigótából, stb. regenerálhatók és egy találmány szerinti rekombináns DNS molekulát tartalmaznak.

A transzformált növényi sejtekből felnevelt növényt magtermelés céljából önmagával keresztezzük. Néhány mag tartalmazni fogja azokat a géneket, amelyek a hasznos és kívánt tulajdonságokat kódolják olyan arányban, ahogy az pontosan megfelel az örökléstan törvényeinek. Ezeket a magokat lehet felhasználni a transzgenikus növények termesztésére.

Homozigóta vonalakat ismételt önbeporzással és beltenyészített vonalakkal lehet kapni. Ezeket a beltenyészített vonalakat újból fel lehet használni hibridek kifejlesztéséhez. Ennél az eljárásnál a szóbanforgó idegen gént tartalmazó beltenyészített vonalat egy másik beltenyészített vonallal keresztezzük termesztés céljára.

A találmány általános leírása után a jobb megértés érdekében speciális kiviteli példákra kell hivatkoznunk, amelyeket magyarázat céljából írunk le, de ezek nem korlátozzák a találmány oltalmi körét, még ha speciális utalás történik is rájuk.

A jelen találmánynak a következőkben részletesen leírt speciális kiviteli formájában egy bázikus kitinázt és egy nem rokon III. osztályú kitinázt (uborka kitináz), - ez a természetben az extracelluláris térbe szekretálódik és nem mutat homológiát az I. osztályú vagy II. osztályú kitinázzal - a találmány szerinti "targeting"-szekvenciával és anélkül *Nicotiana sylvestris* növényekben fejezünk ki és meghatározzuk a növényi sejten belüli elhelyezkedésüket.

Hogy a természetben vakuolárisan előforduló proteinek C-terminális szakaszára szükség van ahhoz, hogy célzottan a vakuólába helyezkedjenek el, valamint hogy fennáll az elvi lehetősége annak, hogy az említett proteinek célzottan kiszilipelődjenek az extracelluláris térbe, ennek bizonyítását dohányból származó egy bázikus kitinázzal, továbbá egy bázikus glükánázzal végezzük el. Úgy járunk el, hogy ezen természetben vakuolárisan előforduló proteineknek 7, illetve 22 C-terminális aminosavból álló C-terminális szakaszát eltávolítjuk, illetve inaktiváljuk úgy, hogy oligonukleotid-mutagenesis révén egy alkalmas stop kodont helyezünk a kódoló szekvencián belüli megfelelő helyre. Ennek következtében a mutált kitináz, illetve glükánáz az extracelluláris térbe jut ki.

Ennek ellenkezőjét bizonyítandó, miszerint az említett találmány szerinti "targeting"-szekvencia képes egy asszociált protein molekulát célzottan a vakuólába vezetni, dohányból származó egy bázikus kitináz C-terminális szekvenciáját uborka-levélből származó savanyú kitinázzal kapcsoltuk össze. Itt

úgy járunk el, hogy először egy bázikus dohány-kitináz 5'-nem kódoló szekvenciáját, valamint az ugyancsak ezen a területen elhelyezkedő, egy szignál-peptidet kódoló szekvenciát az érett uborkakitinázt kódoló szekvenciával kapcsoljuk össze. Ezután ennek a szerkezetnek a 3'-végét egy linker-fragmentumon keresztül ráakasztjuk a dohány kitináz gén C-terminális szakaszából való 9 aminosavat kódoló szekvenciára.

Az előbb leírt szerkezeteket ezután egy erős CaMV 35S promoter szabályozása alá helyezzük és *Agrobacterium*-transzformáció segítségével *Nicotiana glauca* növényekbe visszük be.

Eredményes transzformálás után az átvitt gént tartalmazó erős kitináz kifejeződést mutató növényeket szelektáljuk és a kitináz lokalizációjának analizisére használjuk fel. Protoplasztokat állítunk elő és a kitináz specifikus aktivitásokat homogenizátumokban és protoplasztokban hasonlítjuk össze.

Az intracelluláris kitináz szubcelluláris helyzetének meghatározásához a protoplasztokból vakuólákat izolálunk.

Az alábbi példák nem korlátozzák a találmány oltalmi körét.

ÁLTALÁNOS REKOMBINÁNS DNS-TECHNIKÁK

Minthogy a találmányban használt rekombináns DNS-technikák legtöbbje rutin eljárást jelent a szakemberek számára, inkább itt adjuk rövid leírását az általánosan használt eljárásoknak, mint minden egyes alkalommal azon a helyen, ahol ezek előfordulnak. Ezeket az eljárásokat Maniatis és mtsai kiadványa (1982) tartalmazza, hacsak más hivatkozás nincs.

A. Hasítás restrikciós endonukleázokkal.

A reakcióelegy rendszerint körülbelül 50-500 µg/ml DNS-t tartalmaz, az előállító (New England Biolabs, Beverley, MA., USA) által javasolt puffer oldatban. Minden µg DNS-hez 2-5 egység (E) restrikciós endonukleázt adunk és a reakcióelegyet az előállító által ajánlott hőmérsékleten 1-3 órán keresztül inkubáljuk. A reakciót 10 percig 65°C-on való hevítéssel vagy fenolos extrahálással állítjuk le, amelyet a DNS etanolos kicsapása követ. Ennek a technikának a leírása Maniatis és mtsai kézikönyve (1982) 104-106. oldalán található.

B. A DNS kezelése polimerázzal tompa végek kialakítása céljából.

Egy reakcióelegy 50-500 µg/ml DNS fragmentumot tartalmaz az előállító (New England Biolabs) által ajánlott pufferben. A reakcióelegy mind a négy dezoxinukleotid-trifoszfátot tartalmazza 0,2 mM koncentrációban. A reakciót 30 percig 15°C-on végezzük és 10 percig 65°C-on való hevítéssel állítjuk le. Azokhoz a fragmentumokhoz, amelyeket 5'-nél kiálló végeket kialakító restrikciós endonukleázokkal - ilyen az EcoRI és a BamHI - való hasítással kapunk, a DNS polimeráz nagy fragmentumát, vagy Klenow fragmentjét használjuk. Azokhoz a fragmentumokhoz, amelyeket 3'-nél kiálló végeket kialakító restrikciós endonukleázokkal - ilyen a PstI és SacI - való hasítással kapunk, a T4 DNS-polimerázt használjuk. E két enzim alkalmazásának a leírása Maniatis és mtsai kézikönyve (1982) 113-121. oldalán található.

C. Agaróz gél elektroforézis és a DNS fragmentumok tisztítása a gélekből

Az agaróz gél elektroforéziseket horizontális készülékben végezzük, mint ahogy ezt Maniatisék kézikönyvük 150-163. oldalain leírják. A használt puffer az ott leírt trisz-borát puffer. A DNS fragmentumokat etidium-bromiddal festjük meg, amelyet az elektroforézis alatt a gél-puffer vagy a tank-puffer tartalmaz, vagy amelyet az elektroforézis után adagolunk. A DNS-t ultraibolya fénnel való megvilágítással tesszük láthatóvá. Ha a fragmentumokat a géltől el kell választani, olyan agarózt használunk, amely alacsony hőmérsékleten alvad meg és a Sigma Chemical cégtől (St.Louis, Missouri, USA) szerezhető be. Elektroforézis után a kívánt fragmentumokat kivágjuk, műanyag csövecskékbe helyezzük, 15 percig 65°C-on hevítjük, háromszor fenollal extraháljuk és kétszer etanollal kicsapjuk. Ezt az eljárást némileg megváltoztattuk a Maniatis és mtsai (1982) kézikönyvében a 170. oldalon leírtakhoz képest.

Alternatív eljárás szerint az agarózból a DNS-t Geneclean Kit (Bio 101 Inc., La Jolla, CA., USA) segítségével izolálhatjuk.

D. Szintetikus linker-fragmentumok hozzáillesztése a DNS-végekhez

Ha egy DNS molekula végéhez új endonukleáz hasítási helyet óhajtunk illeszteni, adott esetben a molekulát először DNS-polimerázzal kezeljük, hogy tompa végekhez jussunk, amint ezt fent leírtuk. E fragmentum 0,1-1,0 µg-jához körülbelül

10 ng foszforilált linker-DNS-t (New England Biolabs), 2 μ l T4 DNS-ligázt (New England Biolabs) és 1 mM ATP-t adunk az előállító által javasolt 20-30 μ l pufferben. Egy éjszakán át 15°C-on tartó inkubálás után 10 percig 65°C-on végzett hevítéssel fejezzük be a reakciót.

A reakcióelegyet 100 μ l-re higitjuk a szintetikus linker-szekvenciát hasító restrikciós endonukleázhoz megfelelő pufferrel. Az endonukleázból körülbelül 50-200 egységet adagolunk. Az elegyet 2-6 órán át inkubáljuk a megfelelő hőmérsékleten, majd a fragmentumot agaróz gélben elektroforetizáljuk és tisztítjuk a fent leírtak szerint. A kapott fragmentum-végeknek most olyan végződéseik vannak, amelyeket a restrikciós endonukleázzal való hasítással hoztunk létre. Ezek a végek általában ragadós (kohezív) végek, s így a kapott fragmentum most más könnyen kapcsolható ugyanilyen végekkel rendelkező más fragmentumokhoz.

E. Az 5'-terminális foszfátok eltávolítása a DNS fragmentumokról

A plazmid-klónozó lépés alatt a vektor-plazmid recirkularizációját a foszfátázzal való kezelés csökkenti (lásd Maniatis és mtsai kézikönyve 13. oldalát). A DNS-t a megfelelő restrikciós endonukleázzal hasítjuk, majd hozzáadunk 1 egység borjúbél alkalikus foszfátázt (Boehringer-Mannheim, Mannheim, NSZK). A DNS-t 1 órán át 37°C-on inkubáljuk, ezután fenollal kétszer extraháljuk és etanollal kicsapjuk.

F. A DNS fragmentumok összekapcsolása

Ha komplementer ragadós végekkel ellátott fragmentumokat kell összekapcsolnunk, akkor mindegyik fragmentumból 100 ng-ot 20-40 μ l reakcióelegyben 0,2 egység T4 DNS-ligázzal (New England Biolabs) inkubálunk, a gágyrtó cég által ajánlott pufferben. Az inkubálást 1-20 órán át 15°C-on végezzük. Ha tompa végű DNS fragmentumokat kell összekapcsolni, úgy fentiek szerint inkubálunk, de a T4 DNS-ligáz mennyiségét 2-4-szeresére emeljük.

G. E.coli transzformálása DNS-sel

A legtöbb kísérletben E.coli HB101 törzset használunk. A DNS-t kalcium-kloridos eljárással visszük be E.coliba [Maniatis és mtsai (1982); 250-251. oldal].

H. E.coli szűrése plazmidokra

Transzformálás után a kapott E.coli telepeket a kívánt plazmid jelenlétére egy gyors plazmid izolálási eljárással vizsgáljuk. Két használatos eljárás leírása Maniatis és mtsai kézikönyve 366-369. oldalain található.

I. Plazmid DNS izolálása nagy méretekben

Maniatis és mtsai kézikönyve (1982) 88-94 oldalai tartalmazzák a plazmidok nagy méretekben E.coliból végzett izolálási eljárások leírását.

J. Klónozás M13 fág-vektorokban

A következő leírás úgy értendő, hogy az M13 fág-származékok

kétszálú replikatív formáját használjuk a rutin eljárásokhoz, ilyen a restrikciós endonukleázokkal való hasítás, az összekapcsolás, stb.

Az enzimeket, ha külön nincs utalás, a következő cégektől szerezzük be: Boehringer, Biolabs, BRL (=Bethesda Research Laboratory). Az enzimeket az előállító cégek közlése szerint alkalmazzuk, hacsak nincs külön hivatkozás.

K. Southern blot analízis.

Az extrahált DNS-t először restrikciós enzimekkel kezeljük, majd 0,8-1 %-os agaróz gélben elektroforetizáljuk, ezután nitrocellulóz membránra vesszük át [E.M.Southern (1975)], majd a vizsgálandó DNS-sel, amelyet előzőleg nick-transzlatáltunk ($5 \cdot 10^8$ - $10 \cdot 10^8$ cpm/ μ g DNS specifikus aktivitás) hibridizáljuk. A szűrőket háromszor 1-1 órán át 0,03 M nátrium-citrát és 0,3 M nátrium-klorid vizes oldatával 65°C-on mossuk. A hibridizált DNS-t röntgen filmen (24-48 órás behatás) tesszük láthatóvá.

L. Western blot analízis

A proteineket SDS-poliakrilamid-gél elektroforézis után elektroforézis segítségével nitrocellulóz vagy nylon szűrőre vesszük át. Ezt a szűrőt először egy blokkoló anyaggal (például: 5 %-os sovány tejpor PBS-ben = tej-PBS) előkezeljük. A szűrőt ezután több órán keresztül egy olyan anti-sérummal inkubáljuk, amely az adott vizsgálandó vegyülettel (a jelen esetben kitinázzal) reagál. Az ilyen módon előkezelt szűrőt többször mossuk tej-PBS-sel, majd egy kereskedelemben

kapható enzimmel konjugált második antitesttel [például: peroxidázzal konjugált kecske anti-nyúl antitest (BIORAD) 1:2000-re higitva tej-PBS-sel] inkubáljuk. A szűrőt újra PBS-ben mossuk, ezután a gyártó cég (BIORAD) előírásai szerint klór-naftollal és hidrogén-peroxiddal megfestjük. A további részletek leírását lásd Sambrook és mtsai (1989) közleményében.

M. Peptidek előállításának, tisztításának és automatikus szekvenálásának általános technikái

Redukálás és alkilezés: a tisztított, liofilizált proteint 6 M guanidin.HCl-t tartalmazó 1 M trisz.HCl (pH= 8,6) és 10 mM EDTA oldatában oldjuk. Az oldathoz ditiotritol-t (DTT) adunk 20 mM végkoncentrációig és 4-vinil-piridint 50 mM végkoncentrációig. Az elegyet ezután nitrogén alatt inkubáljuk 1,5 órán át. A piridil-etilezett anyagot ezután HPLC oszlopon [Aquapore fenil-oszlop (2,1x10 cm, Brownlee)] sótanítjuk. Az oszlopot ezután 0,1 %-os trifluor-ecetsavban (TFA) készített acetonitril:izopropanol (1:1) elegy lineáris grádiensével (5 % - 80 %) eluáljuk.

Hasítás brómcíánnal és emésztés piro-glutamát-amino-peptidázzal: a brómcíános hasítást in situ Simpson és Nice (1984) szerint végezzük. A piro-glutamát-aminopeptidázzal (Boehringer-Mannheim) való emésztés Allen (1981) szerint végezhető.

LysC emésztés: a proteint LysC endoproteinázzal (Boehringer-Mannheim) emésztjük, 0,1 M trisz.HCl-ben (pH= 8,5)

24 órán át szobahőmérsékleten, 1:10 enzim:szubsztárum arány alkalmazásával. A kapott peptideket HPLC segítségével [Aqua-pore C-8 oszlop (1x22 cm, Brownlee)] izoláljuk. Eluálószerként 0,1 %-os TFA-ban acetonitril:izopropanol (1:1) elegyének lineáris grádiensét (0 % - 60 %) használjuk.

Tripszines emésztés: a protein tripszines (Cooper) emésztését 0,1 M ammónium-bikarbonát (pH = 8,2) tartalmú 0,1 M kalcium-klorid oldatban 37°C-on, 1:100 enzim:szubsztárum arány mellett végezzük. Az inkubálás időtartama 5 óra. A kapott peptideket HPLC-vel (lásd fent a C. pontot) választjuk el.

Az emésztést másképpen is végezhetjük, 1:50 enzim:szubsztrátum arány mellett, 0,1 M trisz.HCl (pH= 8,5) oldatban, 37°C hőmérsékleten. Ebben az esetben az inkubálás időtartama 24 óra. A kapott peptideket HPLC oszlopon [Vydac C-18 oszlop (2,1x150 mm)] választjuk el, 0,1 % TFA-ban acetonitril:izopropanol (1:1) lineáris grádiensében (0 % - 60 %).

Szekvenálás: az automatizált Edman lebontást az Applied Biosystems 470A gázfázisu szekvenátorával végezzük el. A feniltio-hidantoin (PTH) aminosavak azonosítása az Applied Biosystems 129A PTH-analizátorával történik.

A fenti inkább általános leírás magyarázatául, valamint a találmány jobb megértéséhez ezután a kivitelezés speciális példáit adjuk közre. A példák nem korlátozzák a találmány oldalmi körét még akkor sem, ha speciálisan rájuk hivatkozunk.

Ugyanez vonatkozik minden olyan példaszerű felsorolásra is, amelyeket az eddigi leírás tartalmaz.

I. cDNS táruk és genomiális géntáruk előállítása dohányból

1. példa: Növényi anyag.

A *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növényeket növényházban vagy pedig sterilizált felületű magokból kiindulva termesztjük. A magok felületi sterilizálását a következőképpen végezzük:

Egy körülbelül 200 μm pórusu szitára 20-30 magot teszünk és 10 ml 10 %-os - kereskedelembe beszerezhető - fehérítő oldatban (NaOCl) inkubáljuk. A magokat ezután steril desztillált vízzel többször leöblítjük.

A következő kiviteli példákban elsődlegesen parenchimás bélszövet eredetű klónozott vonalat (N) alkalmazunk, amely Eichholz és mtsai (1983) szerint *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növényekből izolálható.

2. példa: Szövettenyésztés.

A dohányszövetet olyan alaptáptalajon tenyésztjük, amelynek só és tiamin.HCl koncentrációját Linsmeier és Skoog (1965) (LS) állapította meg és amely 10 g/l agar hozzáadásával szilárdítható meg. Az alaptáptalaj tartalmaz még egy pH indikátort, például 5 mg/l klór-fenolvörös-t. A további táptalajok, amelyek az LS alaptáptalajra épülnek és amelyeket a következő kiviteli példákban alkalmazunk, további adalékanyagként például kinetint (1,4 μM) [Citokinin-táptalaj] vagy α -naftil-ecetsavat (10,7 μM) [auxin-táptalaj] vagy pedig

kinetin és α -naftil-ecetsav elegyét [auxin/citokinin-táptala-
laj ("A" táptalaj)] tartalmaznak.

A "B" és "C" szelektív táptalajok nem tartalmaznak α -
-naftil-ecetsavat, helyette olyan szelektív anyagot tartalmaz-
nak, melynek segítségével a transzformált növényi anyagok a
nagy számú nem transzformált sejtek és szövetek közül kiválaszt-
hatók. A szelektív táptalajok pontos összetételét a VII. feje-
zet tartalmazza.

A *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növényekből izo-
lált törzs-vonalat (275N) 21 napos időközönként auxin/cito-
kinin-táptalajon (10 ml) tenyésztjük, azaz mindig egy új
táptalajra (10 ml) oltjuk át és 25°C-on, világosban tenyésztjük.

Hogy a tenyésztett szövetekben magasabb kitináz szint
indukálódjék, a tenyészeteket az auxin/citokinin-táptalajról
egy hormon-mentes alaptáptalajra oltjuk át. A növényi szöve-
tek tenyésztésének a további részleteit Felix és Meins (1985)
ismertették.

3. példa: Dohány protoplasztok előállítása.

Az 1. példa szerint készített 2 napos dohány sejt-
-szuszpenzió 100 ml-ét azonos térfogatu, kétszeres koncent-
rációju enzim oldattal keverjük össze. Az enzim oldat a követ-
kező összetételű:

Cellulase R.10 Onozuka® 10,0 g/l

(Yakult Honsha, Tokió, Japán)

Maceráz (*Rhizopus* sp. eredetű pektináz) 2,5 g/l

(Behring Diagnostics, La Jolla, CA., USA)

Pectolyase Y-23 [®]	1,0 g/l
(Seishin Pharm. Co., Tokió, Japán)	
$\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,45 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,23 g/l
KNO_3	1,2 g/l
D-mannit (pH = 5,70)	73,0 g/l

Fenti enzim oldatot lecentrifugáljuk és 0,2 um pórusu szűrőn átszűrve sterilizáljuk.

A dohány sejt-szuszpenzióból és az enzim oldatból álló reakcióelegyet 5 órán át szobahőmérsékleten körkörös rázógépen óvatosan rázatjuk (40 ford/perc). Meghatározott időközönként mintát veszünk az elegyből és ezeket mikroszkóposan vizsgáljuk. Az enzimes emésztést mindaddig folytatjuk, míg a sejteknek körülbelül 80 %-a át nem alakul gömb alakú protoplasztá. Ezután a tenyésztő edényeket levesszük a rázógépről. A sejt- és protoplaszt-szuszpenziót hagyjuk leülepedni, majd a táptalaj felső felét, amely nem tartalmaz sejteket és protoplasztokat, pipettával leszívjuk és eldobjuk. A maradékot 50 ml-es centrifugacsövekbe vesszük át és 10 percig 500 ford/perc mellett, klinikai centrifugában (Modell HN-SII, IEC) lecentrifugáljuk. A protoplasztokat tartalmazó üledéket az I. mosó-oldatban (VII. fejezet) reszuszpendáljuk és utána 10 percig 1.000 ford/perc mellett újból lecentrifugáljuk.

A protoplasztokat tartalmazó réteg a centrifugacsövek felső részén helyezkedik el. A protoplaszt frakciókat össze-

gyűjtjük és utána az I. mosó-oldattal újból mossuk. A protoplasztokat ismét átviesszük centrifugacsövekbe és a további felhasználásig jégen tároljuk.

4. példa: cDNS géntár előállítás.

A cDNS géntárat poli(A)+RNS-ből kiindulva kapjuk meg, amelyet a *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növény parenchimás bélszövetének klónozott vonalából állítunk elő (lásd az 1. példát). A dohány szövetet előbb a 2. példa szerint magasabb kitináz szint elérésére serkentjük azáltal, hogy hormon-mentes LS táptalajon tenyésztjük.

4.1. Az ÖSSZ-RNS izolálása.

Az össz-RNS feldolgozása lényegében L.M.Lagrimini és mtsai (1987) eljárása szerint történik.

A folyékony nitrogénben mélyhűtött dohány szövetet először durván összezzúzzuk egy mozsárban és ezután a megfelelő homogenizáló puffert [(1) 7,56 M guanidin.HCl, 0,73 M merkapto-etanol, 18,9 mM nátrium-acetát (pH=5,0); vagy (2) 4 % (tömeg/térf) SDS, 0,1 M trisz.HCl, pH= 7,8 (1 térfogatrész) + 80 % fenol (térf/térf), 0,1 % (tömeg/térf) hidroxikinolin, 0,1 M trisz.HCl (pH) 7,8) (1 térfogatrész); vagy (3) L.M.Lagrimini és mtsai (1987) szerint] adunk hozzá (2,5 ml puffer/g szövet). Azonos térfogatrész fenol hozzáadása után az elegyet homogenizáljuk, például Polytron homogenizátorban. Végül fél térfogatrész kloroformot adunk az elegyhez és az emulziót körülbelül 15 percen át óvatosan keverjük.

A különböző fázisokat ezután centrifugálással (10.400 g 10 percen át) különítjük el egymástól; a vizes fázist eldobjuk. Itt tetszés szerint további extrakciós lépéseket alkalmaztunk, például egy pótlólagos fenol-kloroform extrakciót vagy fenol:kloroform:izo-amilalkohol (25:24:1) eleggyel történő kétszeri extrakciót. Az extrakciót a kicsapási lépés követi, mely 0,3 M nátrium-acetát és 2,5 térfogat-rész etanol hozzáadása révén történik. A csapadékot centrifugálással (10.400 g körülbelül 15 percen át) gyűjtjük össze és 2 ml steril vízben reszuszpendáljuk. Ezután 3 M végkoncentrációig litium-kloridot adunk az elegyhez, s az egész elegyet 4°C-on egy éjszakán át inkubáljuk. A csapadékot ezután ismét centrifugálással gyűjtjük össze, s a kapott üledéket lehűtött etanollal mossuk. Az üledéket ezután szárítjuk és 500 μ l steril vízben reszuszpendáljuk. A készítmény össz-RNS koncentrációját spektrofotometriásan határozzuk meg.

A fentiekben leírt eljárás változataként az össz-RNS-t kallusz-szövetből is izolálhatjuk. Ebben az esetben is az előbbiekben leírt eljárási lépéseket alkalmazzuk, kiindulási anyagként kockára vágott kallusz-szövetet (körülbelül 3 mm) alkalmazunk, amelyet a homogenizációs lépés előtt először folyékony nitrogénben lefagyasztunk és ezután egy előre lehűtött mozsárban finom porrá zúzunk.

4.2 Poliadenilezett RNS izolálása

A poli(A)+RNS-t oligo-d(T) cellulóz kromatográfia (Collaborative Research, Lexington, MA., USA) segítségével, ismert eljárás szerint [lásd például: Mohnen (1979)] izoláljuk.

Az oligo-d(T) cellulózt először 15 percig 20 térfogat-rész 2,0 mólos NaCl-ban mossuk, ezután steril vízben reszuszpendáljuk és egy oszlopba (átmérő: 1,5 cm, magassága: 20 cm) töltjük. Az oszlopot puffer oldattal (440 mM NaCl, 0,9 mM EDTA, 9 mM trisz.HCl, pH=7,5; vagy 0,5 M NaCl, 10 mM trisz.HCl, pH=7,5) mindaddig mossuk, míg az átfolyt folyadék a pH= 7,0-7,6 közti értéket eléri. Ezután az RNS oldatokat, amelyek 4,0 ml-ben 0,6-6,0 mg közötti RNS mennyiségeket tartalmaznak, 1 mM EDTA és 10 mM piperazin-1,4-bisz(2-etán-szulfonsav) végkoncentrációra és pH=7,5-re állítjuk be. Az RNS-t 5 percig 70°C-on melegítve és ezután jéggel lehűtve denaturáljuk. Az egész oldatot ezután 0,1 térfogatrész 4 mólos NaCl oldattal 0,36 M NaCl koncentráció értékre állítjuk be. Az RNS oldatot ezután felvisszük az oszlopra és a nem poliadenilezett RNS-t (poli(A)-RNS) a fent említett puffer oldattal eluáljuk. Az eluátum adszorpcióját spektrofotométerrel (Hitachi Modell 100-40, Hitachi, Tokió, Japán) és egy hozzákapcsolt W+W rekorderrel (Scientific Instruments, Bázel, Svájc) határozzuk meg. Mihelyt az abszorpció elérte az alapvonalat, az oszlophoz kötődött poli(A)-RNS-t 1 mM EDTA tartalmu 10 mmólos trisz.HCl (pH=7,5) oldattal eluáljuk. Az eluátumot hozzáadjuk egy 0,5 mM EDTA-t és 0,3 M nátrium-acetátot tartalmazó oldathoz (pH=5,0) és 2,5 térfogatrész etanol hozzáadásával csapjuk ki. Az RNS-t ezután centrifugálással (83.000 g; 30-45 perc) gyűjtjük össze, nitrogénben szárítjuk és 1 mM EDTA, 10 mM trisz (pH= 7,5) oldatában vagy vízben újból reszuszpendáljuk.

4.3 cDNS klónok szerkesztése és szelekciója

A poli(A)+RNS-t preparatív ultracentrifugálás segítségével (57.000 g; 17 óra) 5-25 % (tömeg/térf.) szaccharóz grádiensben (1 mM EDTA; 10 mM trisz.HCl, pH=7,5) egyedi funkciókra bontjuk. Azokat a frakciókat, amelyek a kitináz információit tartalmazzák, in vitro transzláció segítségével anti-kitináz antitestek alkalmazásával azonosítjuk. E frakciókat ezután egyesítjük és a további feldolgozáshoz használjuk fel.

Az anti-kitináz antitestek előállítására szolgáló eljárást a szakemberek ismertik, amely például Shinshi és mtsai (1985) illetve Mohnen (1985) által leírt eljárások szerint valósítható meg. Eszerint tisztított kitináz készítmények komplett Freund adjuvánssal készített emulziójával három hónapos nőtény nyulakat (Nee Zeeland fehér nyulak) oltunk. A további oltásokat egy, illetve két hét után, a továbbiakban havi időközönként adjuk. A vérvétel mindig az oltán utáni 7-10. napon történik. A szérum-mintákat -20°C -on tároljuk. Az immunglobulin G-t affinitás kromatográfián tisztítjuk Protein A- Sepharose Cl 4B oszlopon (Pharmacia), majd liofilizáljuk és -20°C -on tárdjuk.

A poli(A)+RNS templátról kiinduló kétszálu DNS szintézisét a kétszálu DNS klónozását pBR322-ben, a differenciáló telephibridizálást és a plazmid izolálást lényegében Maniatis és mtsai (1982) előírásai és leírása szerint végezzük.

Körülbelül $0,8\text{ }\mu\text{g}$ kétszálu DNS szintéziséhez $3\text{ }\mu\text{g}$ előzőleg izolált és kitináz mRNS-sel dusított poli(A)+RNS-t

reverz transzkriptázzal (Life Sciences, St.Petersburg, FL., USA), valamint DNS polimeráz I-gyel (New England Biolabs, Beverley, MA., USA) inkubálunk. Az így kapott cDNS-t "homo-polimer dC-dG farkazó" módszerrel, mely a cDNS-t és a vektor DNS-t komplementer koheziv végekkel látja el - és amelyet Maniatis és mtsai (1982) kézikönyvük 217-219. oldalán részletesen leírtak - a pBR322 PstI hasítási helyére toldjuk be. A PstI-gyel linearizált és oligo-dC végekkel ellátott pBR322 vektor a kereskedelemről beszerezhető.

A kapott rekombináns plazmidot ezután kompetens E.coli DH1 sejtek transzformálására használjuk. A plazmidok klónozását Maniatis és mtsai (1982) kézikönyvében, a 242-246 és 391 oldalon részletesen leírják.

Az ilyen módon szerkesztett cDNS tárat, amely baktérium telepek formájában agarlemezeken áll rendelkezésre, szűrővizsgálatnak vetjük alá radioaktív jelzett cDNS-sel végzett telephibridizálás segítségével.

A differenciáló telephibridizálás során a baktérium telepekből nitrocellulóz szűrőkön duplikátumokat állítunk elő úgy, hogy a szűrőt az agar lemezre helyezzük, majd óvatosan ismét lehuzzuk róla. Az eredeti agar lemezt megőrizzük a pozitív telepek későbbi azonosítása céljából. A szűrőt, amelyhez a baktérium-telepek hozzátapadtak, ezt követően táptalajra helyezzük és ott hagyjuk mindaddig, míg a telepek körülbelül 2 mm nagyságú klónokká növekednek. A szűrőt ezután nátrium-hidroxid oldattal kezeljük. A kezelés a baktérium sejtek lizisét, a bakteriális DNS denaturálódását és a szűrőhöz való

fixálását eredményezi. Semleges pH beállítása után a szűrőt többször mossuk, megszárítjuk és végül 80°C hőmérsékleten és vákuumban "megsütjük", amikor is a DNS kovalensen kötődik a szűrőhöz.

A szűrőket kétszer egymás után readioaktiv jelzett (nem-klónozott) cDNS szondákkal hibridizáljuk. Ezen cDNS szondák esetében olyan dohányyszövetből előállított poli(A)+RNS-ről van szó, amelyben előzőleg kitináz termelést indukáltunk (hét napos inkubálás hormon nélküli alaptáptalajon), valamint olyan poli(A)+RNS-ről, amely nem-indukált dohány szövetből származik (hét napos inkubálás auxin/citokinin tartalmu táptalajon). Az ígéretes cDNS klónokat, amelyek erősebben reagálnak az indukált szövetekből származó cDNS-sel, mint a nem-indukált szövetekből származó kontroll DNS-sel, "Hybrid-select" transzlációs eljárás segítségével, Mohnen és mtsai (1985) és Mohnen (1985) leírása szerint tovább analizáljuk. A plazmid DNS-t 0,2-0,3 M NaOH és 3 M NaCl tartalmu oldatban egy perces főzéssel denaturáljuk és ezután jégen lehűtjük. A hibridizáló reakciót négyyszögletes BA/85 nitrocellulóz szűrőkön (Schleicher and Schüll, Dassel, NSZK), szűrőnként 200-250 µg össz-RNS alkalmazásával végezzük. A szűrőkről a hibridizált RNS-t eluáljuk, etanollal kicsapjuk, 10 µl vízben feloldjuk és in vitro transzláció segítségével (kereskedelemben beszerezhető búza-csíra használatával) analizáljuk. A radioaktiv jelzett termékeket a kívánt proteinnel szembeni antitestekkel kicsapjuk és SDS-poliakrilamid-gél elektroforézissel analizáljuk.

4.4 pCHN48_cDNS klón

A cDNS géntárat Maniatis és mtsai (1982) szerint telep-, illetve plakk-hibridizáció segítségével szűrővizsgálatnak vetjük alá. DNS szondaként a Shinshi és mtsai (1987) által leírt pCHN50 cDNS klón szolgál, amely az összes, az érett proteint kódoló DNS szekvenciát tartalmazza, de hiányzik belőle a komplett N-terminális szignál-peptid szekvencia. Ilyen módon eltérő hosszúságú különböző klónokat nyerünk. Kiválasztjuk a leghosszabb klónt és elvégezzük a nukleotid szekvencia analízist. Ez a klón, amelyet pCHN48 elnevezéssel láttunk el, egy 1,14 kb méretű inszertumot tartalmaz, a poli(A) végen 7 adenzinnal, valamint egyetlen nagy, 987 nukleotid hosszúságú leolvasási keretet ("open reading frame"), amely egy 329 aminosavból álló polipeptidnek, valamint az 5'-nem-transzlatált szakaszból egy nukleotidnak felel meg. A kódoló szakasz DNS szekvenciájából levezethető aminosav szekvencia megfelel a dohányból izolált ismert kitinázok első 20 N-terminális aminosavának.

5. példa: genomiális géntár szerkesztése

5.1 Kromoszómális dohány_DNS izolálása

A protoplasztok lizálása céljából 100 ml jéghideg protoplaszt szuszpenziót 400 ml jéghideg TENP-pufferrel (lásd a VII. fejezetet) keverünk össze. Az eluátumból a magokat IEC klinikai centrifugán 2.000 ford/perc mellett, centrifugálással választjuk el. Az így kapott üledéket 500 ml lehűtött TENP-pufferben újból reszuszpendáljuk és - mint előzőleg leírtuk - ismét ülepitjük. Ezt követően előkészítünk nyolc

CsCl (cézium-klorid) grádines csövecskét úgy, hogy minden csőbe körülbelül 12,5 ml protoplaszt szuszpenzióból származó sejtüledéket mérünk be 26 ml tizszeres koncentrációju TE pufferhez (lásd a VII. fejezetet). A sejtmagok lizálása céljából ehhez az elegyhez 5 ml 20 %-os (tömeg/térf) nátrium-lauril-szarkozin oldatot adunk, valamint 32,2 g CsCl-ot és 2,89 ml etidium-bromid oldatot (EtBr; 10 mg/ml) adunk hozzá. Az egész elegyet enyhén átkeverjük, hogy a CsCl feloldódjék.

Az így előállított lizátumokat poliallómer csövekbe (Beckman VTi50, 39 ml-es csövek) visszük át és 45.000 ford/perc mellett 20°C hőmérsékleten 16 órán át centrifugáljuk VTi50 rotorban (Beckman). Az UV-fényben fluoreszkáló sávokat 3 ml-es fecskendővel 16-os tűkkel a grádiensből leszívjuk és összegyűjtjük. A DNS további feldolgozása az előzőekben leírt CsCl/EtBr egyensúlyi centrifugálás ismétlésével történik. A fluoreszkáló sávokat ismét összegyűjtjük és a hozzátapadt EtBr-ot hat egymást követő extrakciós lépésben, 20xSSC-vel (lásd a VII. fejezetet) telített (azonos térfogat) izopropanol használatával távolítjuk el. Az előbbieken leírt módon tisztított grádiens-oldatból a DNS-t úgy csapjuk ki, hogy egymás után 2 térfogatrész desztillált vizet, 0,1 térfogatrész 3,0 M nátrium-acetátot (pH = 5,4) és 2 térfogatrész etanolt adunk hozzá. A szálalaku DNS-t az oldatból Pasteur pipetta segítségével felgombolyítjuk, 70 %-os etanolban mossuk és azonos térfogatú kloroformmal tovább extraháljuk. A DNS-t 0,1 térfogatrész 3 M nátrium-acetát (pH=5,4) és 2 térfogatrész etanol hozzáadásával kicsapjuk. A DNS szálakat ismét feltekerjük,

70 %-os etanolban mossuk és 5 percen át levegőn szárítjuk. Ezután 7 ml össztérfogatu TE-pufferben (lásd a VII. fejezetet) feloldjuk és a további felhasználásig 4°C-on tároljuk.

5.2 Genomiális λ géntár szerkesztése

Az előzőleg izolált dohány DNS-t Sau3A restrikciós enzimmel emésztjük és 20 órán át 10-40%-os szaccharóz grádiensben, SW41 rotorban (Beckman) 20.000 ford/perc mellett választjuk el. A grádiensből kapott frakciókat gélelektroforézissel (0,5 %-os agaróz gél TBE pufferben) analizáljuk. Azokat a frakciókat, amelyek a megfelelő méretű fragmentumokat tartalmazzák, egyesítjük. A DNS-t 1/10 térfogatrész 3 M nátrium-acetáttal (pH=4,8) és 2 térfogatrész etanollal kicsapjuk, majd BamHI-gyel emésztett, foszfátazzal kezelt λ EMBL3 DNS-sel (Stratagen, La Jolla, CA., USA) ligáljuk. A ligáz reakciót az előállító cég előírása szerint végezzük, azaz mindig 5 μ l reakcióelegyet alkalmazunk, mely 1 μ g λ -vektor-DNS-t és 0,1 μ g beépítendő dohány DNS-t tartalmaz. Az ezzel az összekapcsolási reakcióból kapott DNS-nek a λ -fágok fej-részébe való bepakolását Gigapack Plus Kit (Stratagene) segítségével végezzük az előállító cég utmutatásai szerint. Az E.coli CES201 (Glover DM) megfertőzése utáni fág hozam körülbelül $2 \cdot 10^6$ fág pro μ g beépített DNS.

5.3 A géntárak szűrővizsgálata és a genomiális klónok izolálása

A genomiális géntárak szűrővizsgálatát Maniatis és mtsai (1982) szerint telep-, illetve plakk-hibridizálással végezzük.

DNS szondaként a Shinshi és mtsai (1987) által leírt pCHN50 cDNS klón, valamint a 4.4 példában leírt módon izolált pCHN48 klón szolgál.

Az ilyen módon kapott rekombinánsokat tisztítjuk és Southern blot analízis segítségével részlegesen jellemezzük. E klónok közül egyet, amely a pCHN50 és pCHN48 cDNS szonda-molekulákkal igen erős hibridizációs szignált mutatott és amely a Southern blot analízis szerint a komplett kitináz gént tartalmazta, további vizsgálatok céljára kiválasztottunk és λ CHN17-nek neveztük el.

6. példa: A genomiális λ CHN17 dohány kitináz klón

6.1 DNS szekvenálás és szekvencia analízis

HindIII restrikciós enzimmel való emésztés után egy 5,4 kb méretű DNS fragmentumot kapunk, amely a komplett kitináz gént tartalmazza és a dohány DNS-ből származó egy azonos méretű fragmentumnak felel meg. Ezután e fragmentum egy részét, amely 3850 bp-t foglal magába és a teljes kódoló szekvenciát tartalmazza, szekvenáljuk.

A restrikciós fragmentumokat megfelelő klónozó vektorokba - ilyen például az M13mp18 vagy M13mp19 [Yanisch-Perron és mtsai (1985)] - klónozzuk és mindkét irányban didezoxi-nukleotid módszer [“dideoxynucleotide chain-termination method”; Sanger és mtsai (1977)] segítségével szekvenáljuk. A meghatározott nukleotid és aminosav szekvenciákat komputerrel, "Genetics Computer Group Software" [Devereux és mtsai (1984)] alkalmazásával tovább analizáltuk.

A dohányból származó bázikus kitináz gén teljes DNS szekvenciáját, amely a "gén 48" elnevezést kapta, a 10-es számú (SEQ ID NO:10) szekvencia mutatja be. Ennek a szekvenciának a pCHN48 és pCHN50 cDNS klónokkal való összehasonlítása alapján nyilvánvaló, hogy a "gén 48" kódoló szakaszán belül két közbeeső szekvencia szakasz (intron) van közbeiktatva. Az intronok közül az első 274 bázispárt foglal magába és a glicint kódoló 148-as kodon első és második nukleotidja között helyezkedik el. A második intron 269 bázispár hosszúságú és a hisztidint kódoló 199-es kodon második és harmadik nukleotidja között helyezkedik el. Mindkét intron, megegyezően más ismert növényi és állati intronokkal, a szokott összeillesztési helyekkel rendelkezik, amelyek egy donor és egy akceptor szekvenciát (GTAAGTC és ACAG) tartalmaznak. Ezenkívül mindkét intron a 3' szélről 33 nukleotid távolságra a CT(G/A)A(C/T) szekvenciát tartalmazza, amely hasonlóságokat mutat az állati, általánosan elfogadott szekvenciákkal (PyTPuAPy). Ezek az általánosan elfogadott szekvenciák a kinasztás során részt vesznek hurokformájú közti termékek képzésében.

A "gén 48" exonjának nukleotid szekvenciája azonos a pCHN48 klón kódoló szakaszának a DNS szekvenciájával.

7. példa: cDNS géntár előállítása uborkalevelekből

7.1 Az uborka kitináz tisztítása és protein szekvenciája

Egy patogének által indukálható kitináz proteint izoláltunk fertőzött uborka levelekből a Métraux (1988) által leírt módszer szerint. Ezután e homogén protein készítményből,

általánosan ismert eljárások segítségével, peptid fragmentumokat állítottunk elő. A peptid fragmentumok aminosav szekvenciáját a következőkben foglaljuk össze:

Amino-Terminusz Ala Gly Ile Ala Ile Tyr Trp Gly Gln Asn Gly
Asn Glu Gly Ser Leu Ala Ser Thr Cys Ala Thr
Gly Asn Tyr Glu Phe Val Asn Ile Ala Phe Leu

LysC Peptidek (Lys) Asn Phe Gly Gln Val Ile Leu Ser Ala Ala
Pro Gln Cys Pro Ile Pro Asp Ala His Leu Asp
Ala Ala Ile Lys
(Lys) Thr Gly Leu Phe Asp Ser Val Trp Val Gln
Phe Tyr Asn Asn Pro Pro Cys Met Phe Ala Asp
Asn Ala Asp Asn Leu Leu Ser
(Lys) Leu Tyr Met Gly Leu Pro Ala Ala Arg Glu
Ala Ala Pro Ser Gly Gly Phe Ile Pro Ala Asp
(Lys) Ala Ser Ser Asn Tyr Gly Gly Val Met Leu
Trp Ser Lys

CNBR Peptidek (Met) Phe Ala Asp Asn Ala Asp Asn Leu Leu Ser
(Met) Gly Leu Pro Ala Ala Arg Glu Ala Ala Pro
Ser Gly Gly Phe Ile Pro Ala Asp Val Leu Ile
Ser Gln - Val Leu Pro Thr Ile

Tripszines

Peptidek Val Leu Leu Ser Ile Gly Gly Gly Ala
Thr Gly Leu Phe Asp ? Val
Leu Tyr Met Gly Leu Pro Ala Ala
Ala Ser Ser Asn Tyr Gly Gly Val
Ala Phe Asp Asn Gly Tyr

7.2 _cDNS gyűjtemény_előállítása_TNV-vel_fertőzött_ uborka_levelékből

Uborka leveleket dohány nekrosis vírussal (TNV= tabak nekrosis virus) fertőzünk. A fertőzés után 5 nappal a fentiek-

ben leírtak szerint (lásd a 4.1. példát) izoláltuk az RNS-t.

A poliadenilezett RNS-t (poli(A)+RNS) standard eljárások segítségével (lásd a 4.2. példát) izoláljuk és cDNS géntár előállítására használjuk fel. Ezeket lényegében a Gubler és Hoffman (1983) által leírt eljárás szerint egy Zap klónozó vektorban (Stratagene) állítottuk elő.

7.3 Uborka kitináz kódozó cDNS klónok izolálása

Oligonukleotid szondák előállítása céljából az előzőleg meghatározott protein szekvenciákból két szakaszt választottunk ki. A szintetizált oligonukleotid szondák a mRNS minden olyan lehetséges kombinációját fedik, amelyek képesek a kiválasztott peptideket kódolni:

G T A

Szonda 1: 5' - CCATTCTGNCCCCAGTA - 3'

G G G G G

Szonda 2: 5' - GGATTATTATAAAATTGNACCCA - 3'

Az előzőleg szerkesztett cDNS tárból közel 300.000 plakkot vittünk lemezre. A plakkok két lenyomatát a ³²P-vel jelzett 1-es oligonukleotid keverék (szonda 1) vagy 2-es oligonukleotid keverék (szonda 2) használatával teszteltük. Azokat a plakkokat, amelyek mindkét szondával pozitív eredményt adtak, izoláltuk. A plakkok izolálását, valamint az automatikus kihasítást az előállító cég előírásai szerint (Stratagene Lambda Zap Laboratory Manual, Stratagen, San Diego, USA) végeztük el.

Egy megfelelő pozitív klónt bevittünk a Bluescript plazmidba és pBSCucCh5 jelzéssel láttuk el. E cDNS klón szekvenciája didezoxi-szekvenálással határozható meg (lásd:

SEQ ID NO: 11).

II. KITINÁZ ÉS GLÜKANÁZ MUTÁNSOK SZERKESZTÉSE

II.1. Kitináz mutánsok

8. példa: Új restrikciós hasítási helyek beiktatása

A kitináz mutánsok szerkesztésekor a mindenkor alkalmazott kitináz klónok különböző részeit kapcsoljuk egymással össze. Ahhoz, hogy ezt a célt elérhessük, a részeknek kompatibiliseknek kell lenniük, azaz megfelelő restrikciós hasítási helyeket kell a különböző szekvenciákba bevinni. A következőkben az alább felsorolt restrikciós hasítási helyeket alkalmaztuk, melyek mindegyike azonos kohezív végeket eredményezett:

BamHI (G/GATCC)

BclI (T/GATCA)

BglII (A/GATCT)

A leolvasási keretet mindig úgy választjuk meg, hogy a GAT kodon aszparagint kódoljon.

9. példa: Dohány kitináz gén mutánsok szerkesztése

A CHN17 genomiális kitináz klón egy szubklónozott fragmentumából (előállítását lásd a 12.2. példában), a pCHN87-ből származó EcoRI/HindIII inszertumnak a pTZ18R plazmidba való bevitelével kapjuk a pTRCH1-et. A pTZ18R plazmid a Pharmacia cégtől szerezhető be.

A pCHN48 cDNS klón inszertumát (lásd a 4.4 példát), amely a teljes cDNS szekvenciát tartalmazza, PstI-gyel történő részleges emésztéssel izoláljuk és a pUC8 plazmidba kló-

nozzuk be, ezáltal két különböző klón keletkezik (pUCH2 és pUCH3), amelyek a polilinkerbe beépített inszertum irányítotttsága tekintetében különböznek egymástól.

Ezután a pUCH2-ből származó EcoRI/HindIII fragmentumot izoláljuk és beviesszük a pTZ18U plazmidba. Ilyen módon kapjuk a pTUCH2 plazmidot. A pTZ18U plazmid szintén a Pharmacia cégtől szerezhető be.

A pUCH3-ből származó EcoRI/HindIII fragmentumot szintén izoláljuk és beklónozzuk a pTZ18R plazmidba. Az így képződött klónt pTRCH3 jelzéssel láttuk el.

10. példa: Oligonukleotid-közvetítette mutagenézis.

Az oligonukleotid-közvetítette mutagenézis számára a szakemberek által ismert rutin módszerek segítségével a következő oligonukleotidokat szintetizáltuk:

- #1 CTGCCTCGGC TGATCA ATGTGG
- #2 TTTGGAAATT GACTC TTAGTCG
- #3 CCAG AGATCT TTTGGGAAATGG
- #4 GACTTTTAGTCAAATACTATGTAA
- #5 GACTTTTAGTCCGTACTATGTAA
- #6 CTTTGGAAA AGATCT TTTAGTCG
- #7 CCGCTCTTC GGATCC GGCTGG
- #8 CAGCATCGGΔ TGATCA GGAAGCTC
- #9 CATCT TCTAGA TTTAGTCTC

A vadtypussal szemben megváltoztatott nukleotidokat aláhúztuk és vastag betűvel jeleztük.

A restrikciós hasítási helyeket üres hellyel jeleztük.

A #8 oligonukleotidban a deléciót Δ -val jelöltük.

A #3 és #8 oligonukleotidban az inszerciót dőlt betűvel írtuk.

10.1 A dohány kitináz klón mutagenizálása

Egyszálalás plazmidok előállítására céljából a kiindulási plazmidokat az *E. coli* egy dam^- törzsébe visszük be úgy, hogy a baktériumok egy éjszakás tenyészetét M13KO7 segítőfággal (Pharmacia) fertőzzük meg. Ezt követően a plazmidokat igen egyszerűen ki lehet csapni a tenyészet felülusójából ammónium-acetát és polietilén-glikol (PEG 6000) segítségével, majd fenol/kloroform eleggyel és kloroformmal extrahálunk. Etanollal végzett ismételt kicsapások után az izolált DNS-t használjuk a tulajdonképpeni mutagenézishoz (minden mutagenézishoz körülbelül 5 ml tenyészetből származó DNS-t használunk).

Az oligonukleotidok mindegyikéből 200 pmólos mennyiséget foszforilálunk 30 μ l 0,1 M trisz.HCl (pH) 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 6 mM DTT, 2 mM ATP és 5 egység T4 polinukleotid kináz jelenlétében 45 percen át 37°C hőmérsékleten. Az ezt követő 10 perces 60°C-on végzett inkubálás a reakciót leállítja.

Az egyszálalú DNS-t 2,5 μ l foszforilált oligonukleotiddal és 1 μ l A oldattal [0,2 M trisz.HCl (pH=7,5), 0,1 M $MgCl_2$, 0,5 M NaCl, 10 mM DTT] 30 μ l végső térfogatban keverjük össze, majd először 5 percig 80°C-on és ezután 20 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.

Ezután minden csőhöz 13 μ l-t adunk a következő elegyből:

18,5 μ l H_2O

2,0 μ l B oldat [0,2 M trisz.HCl (pH=7,5), 0,2 M $MgCl_2$,
0,1 mM DTT]

2,0 μ l 10 mM ATP

2,0 μ l dNTP keverék (10-10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

1,0 µl Klenow fragment

0,5 µl T4 DNS ligáz

Az elegyet 30 percig 32°C hőmérsékleten, majd ezután még 2-16 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk.

A reakcióelegy negyedrésszével kompetens Ecoli mutS (kijavító képességgel nem rendelkező törzs) sejteket transzformálunk. Ezeket a sejteket 3-6 órán át 2 x L táptalajban vagy 2 x TY táptalajban rázatjuk 37°C-on. Ezután a plazmid DNS-t minipreparatív módszerrel izoláljuk. A módszert az ezen a területen jártas szakemberek ismerik. Ezután az izolált DNS-sel kompetens E.coli DH5a sejteket transzformálunk. A sejteket ampicillin tartalmu táptalajra szélesztjük. A mutánsok ezután igen egyszerűen azonosíthatók telep hibridizálással, radioaktív jelzett mutagén oligonukleotidok alkalmazásával. Kiegészítésképpen el lehet végezni a restriktációs analízist, minthogy minden mutáns a mutáció következtében egy hasítási hellyel többet tartalmaz vagy egyet elveszített.

10.1.2. pTRCH4

A pTRCH4 plazmidot a #1 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. A kapott plazmidot pTRCH4 jelzéssel láttuk el. E mutáció során egy BclI restriktációs hasítási helyet vittünk be az érett kitináz kódoló DNS szekvencia első kodonjánál, s ezáltal a kódolt aminosav glutaminsav helyett aszparaginsavvá (Glu → Asp) változott.

10.1.3. pTRCH6

A pTRCH3 plazmidot a #2 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. Az újonnan keletkezett plazmidnak pTRCH6 elnevezést adtunk. A mutáció során a 300-as kodon, amely az érett kitinázt kódoló DNS szekvenciában glicint kódol, egy stop-kodonná (Gly300 → stop300) változott, s egyidejűleg egy HinfI restrikciós hasítási helyet is bevittünk.

10.1.4. pTUCH6

A pTRCH3 HindIII/PvuII fragmentumát és a pTRCH6 PvuII/HindIII fragmentumát, melyek a fenti mutációkat tartalmazzák, az előzőleg HindIII/EcoRI-gyel hasított pTZ18U vektorba vittük be. Ilyen módon állítottuk elő a pTUCH6 plazmidot.

10.1.5. pTUCH7

A pTUCH2 a #3 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. A kapott plazmidot pTUCH7-nek neveztük el. A mutáció során az érett kitinázt kódoló DNS szekvenciába, a 295/296 kodon területére, egy BglII restrikciós hasítási helyet vittünk be. Minthogy ez a restrikciós hasítási hely egy másik leolvasási keretben helyezkedik el, mint az eddig leírt mutánsok esetében, a 297-es kodonnál egy G-t építettünk be. Ezen a módon újból egy kompatibilis leolvasási keretet kaptunk.

10.1.6. pTUCH8

A pTUCH2 plazmidot a #4 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. Az új plazmidot pTUCH8 jelzéssel láttuk el. A mutáció során az érett kitinázt kódoló DNS szekvenciában a 304-es kodon aszparaginsavról aszparaginná (Asp304 → Asn304) változott, mely egy TaqI hasítási hely elvesztéséhez vezetett.

10.1.7. pTUCH9

A pTUCH2 plazmidot a 5 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. A kapott plazmidot pTUCH9-nek neveztük el. A mutáció során a 304-es kodonban az aszparaginsav argininre (Asp304→Arg304) változott, s ez szintén egy TaqI hasítási hely elvesztését okozta.

10.1.8. pTUCH10

A pTUCH2 plazmidot a #6 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. A kapott plazmidot pTUCH10 jelzéssel láttuk el. A mutáció során a 299-es kodon aszparaginról lizinre (Asn299→Lys299) változott és a 300-as kodon glicinről aszparaginsavra (Gly300→Asp300) változott. Egyidejűleg egy BglIII hasítási hely keletkezett.

10.2 Az uborka kitináz klón mutagenizálása

Az uborka kitináz klón mutagenizálását az 11.1. példában leírt eljárás szerint végeztük.

A pBSCucCh5 uborka kitináz cDNS klónból származó EcoRI inszertumot (lásd a 7. példát) beklónoztuk a pTZ18U plazmidba. Az ilyen módon szerkesztett plazmidot pTUCU2-vel jelöltük.

10.2.1 pTUCU4

A pTUCU2 plazmidot a #7 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. A kapott új plazmidot pTUCU4-gyel jelöltük. A mutáció során a szignál-peptidet kódoló szekvencia utolsó kodonjába egy BamHI restrikciós hasítási helyet vittünk be, miáltal a következő kodon úgy változott meg, hogy az most már alanin helyett prolin aminosavat kódolt (Ala1→Prol).

10.2.2 pTUCU5

A pTUCU2 plazmidot a #8 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. Az újonnan keletkezett plazmidot pTUCU5 jelzéssel láttuk el. A mutáció során az uborka kitináz stop-kodonjának a területére egy BclI restrikciós hasítási helyet vittünk be. Ezáltal a stop-kodon aszparaginsav kodonná alakult át (stop268 → Asp268).

10.2.3 pTUCU6

A pTUCU2 plazmidot a #9 oligonukleotid segítségével mutagenizáltuk. Az újonnan keletkezett plazmidot pTUCU6-tal jeöltük. A mutáció során a cDNS szekvencia 3' nem kódoló szekvenciájának a területére egy XbaI restrikciós hasítási helyet vittünk be (a pBSCucCht5 klón 981-986-os nukleotidjainak a területére), így lehetővé vált a pGY1 vektorba történő klónozás.

II.2. GLÜKANÁZ MUTÁNSOK

11. példa: PCR-rel végzett mutagenizálás

A C-terminális szakasz első aminosavát kódoló bázis-tripletet (GTC=valin) PCR módszer alkalmazásával a TGA stop-kodonban megváltoztattuk.

A PCR mutagnizációs eljárások keresztülvitelét a területen dolgozó szakemberek jól ismerik. Az eljárások például a következő közleményekben találhatók: Wang és mtsai (1989); Innis és mtsai (1990); Erlich (1989).

Egy megfelelő PCR-készlet (PCR-kit) vagy a Perkin-Elmer Cetus cégtől (Norwalk, Conn., USA) vagy más előállítóktól szerezhető be és a kitben lévő utasításoknak megfelelően végezhető az eljárás.

11.1_A_pCIB1005B Δ VTP szerkesztése

Ez a szerkezet az American Type Culture Collection intézménynél (Rockville, Maryland, USA) ATCC 40770 számon le-tétbe helyezett és az EP-A 0,392,225 európai szabadalmi be-jelentésben részletesen leírt szerkesztésű pCIB1005B plazmid-ból előállítható.

A pCIB1005B plazmid - egy CaMN 35S expressziós vektor-ban - egy dohányból származó komplett, kiméra, bázikus pre-pro- β -1,3-glükánázt kódol, amely teljes N-terminális szignál-szekvenciával és egy 22 aminosavat magábafooglaló C-terminá-lis szakasszal rendelkezik.

A pCIB1005B Δ VTR plazmid, amelynek az előállítását a következőkben írjuk le, ugyanezt a glükánázt kódolja, ebben azonban a 22 aminosavból álló C-terminális szakasz, egy stop-kodonnak az érett proteint kódoló szekvencia végére való be-vitele révén, funkcionális szempontból deletált.

A PCR amplifikálás során a következő oligonukleotidokat alkalmaztuk:

- Oligo1: 5'- GGG ACA CAC GTG CAC CTT - 3'
Oligo2: 5'- CTG TCC CAA ACT CCA CCA GAT CAC CCA AAG TTG
ATA TTA TAT T - 3'
Oligo3: 5'- AAT ATA ATA TCA ACT TTG GGT GAT CTG GTG GAG
TTT GGG ACA G - 3'
Oligo4: 5'- GCC TCC CCT TCA TCG TCC - 3'

Az oligonukleotid 1 (oligo1) a glükánáz-DNS kódoló szakaszában egy olyan szekvenciának felel meg, amely az ott található XhoI hasítási helytől 5' irányban (upstream) helyezkedik el.

Az oligonukleotid 3 (oligo3) az érett glükánáz proteint kódoló szekvencia 3' végének a területén lévő szakaszt foglalja magába, melyet a bevezetendő stop-kodon, valamint a C-terminális szakaszt kódoló szekvencia egy része követ.

Az oligonukleotid 2 (oligo2) szekvencia az oligo3 szekvenciának felel meg, azonban ellentétes irányú.

Az oligonukleotid 4 (oligo4) egy olyan szekvenciából áll, amely a pCIB1005B tm1 3' szakaszában helyezkedik el, az ott lévő SacI hasítási helytől 3' irányban (downstream).

Három PCR reakciót végeztünk el:

- (1) PCR1: a reakcióban az oligo1 és az oligo2 primerként és a pCIB1005B templátként vett részt;
- (2) PCR2: a reakcióban az oligo2 és az oligo4 primerként és a pCIB1005B templátként vett részt;
- (3) PCR3: a reakcióban az oligo1 és oligo4 primerként és a PCR1 és PCR2 reakció termékei templátként vettek részt. A PCR3 reakció első két ciklusát csak a templátokkal végeztük el, s csak ezután adtuk hozzá a primereket.

A PCR3 reakció termékét SacI-gyel és XhoI-gyel emésztjük és agaróz gélben választjuk szét. A 725 bp-nek megfelelő csíkot a gélből kivágjuk és tisztítjuk.

Ezután a pCIB1005B plazmidot ugyancsak XhoI-gyel és SacI-gyel emésztjük és egy éjjelen át az emésztett és tisztított PCR3 fragmentummal ligáz-reakció segítségével összekapcsoljuk. A ligációs elegyet kompetens E.coli DH5a sejtek transzformálásához használjuk. A transzformált sejtek kiválasztása ampicillinnel történik. A pCIB1005B és a pCIB1005B Δ VTP plazmidokat a transzformált sejtek egy éjszakás tenyészetéből izolálhatjuk, melyekkel ezután *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztokat transzficiálhatunk. Az ilyen módon előállított szerkezet korrektségét szekvencia analízissel igazoljuk.

III. KITINÁZ MUTÁNSOK BEÉPÍTÉSE NÖVÉNYI EXPRESSZIÓS-PLAZMIDBA

12. példa: A pSCH10 plazmid szerkesztése

A pSCH10 plazmid a CHN17 genomiális klónból, valamint a CHN48 cDNS klónból származó dohány kitináz kódoló szekvenciát tartalmazza a pGY1 vektor-plazmidba beépítve. Ezt a szekvenciát a CaMV vírus 35S promotere, valamint ennek terminációs szekvenciái határolják. E szerkezet esetében egy vad típusu kitináz szerkezetről van szó, amelyet a következőkben részletesen ismertetünk.

12.1. P pGY1 plazmid szerkesztése

A pGY1 plazmid a Pietrzak és mtsai (1986) által leírt pDH51 növényi expressziós vektorból vezethető le. A pGY1 plazmidban a kiindulási pDH51 plazmid NcoI hasítási helyét egy XhoI hasítási hellyel cseréltük ki.

A pDH51 plazmidot NcoI-gyel hasítjuk és a kilógó végeket Klenow polimeráz révén töltjük be. Az így kapott tompa végeket ezután egy XhoI linkerrel (CCTCGAGG3) ligáljuk.

12.2 A pSCH10 plazmid szerkesztése

A pSCH10 plazmid tartalmazza a kitináz kódoló szekvenciát, az 5' átírt nem-kódoló szekvenciát, a kitináz "gén 48" 21 bázis-párját, mely a transzkripció kiindulási helyétől 5' irányban (upstream) helyezkedik el, valamint egy 31 bp-t magába foglaló nem-kódoló szekvenciát a pGY1 CaMV 35S növényi expressziós vektor BamHI/PstI klónozó helyére béeépítve.

A pSCH10 plazmid előállításához szükséges eljárás lépéseit az alábbiakban részletesebben ismertetjük:

- (1) A kitináz "gén 48"-at tartalmazó λ CHN17 genomiális klónt HindIII-mal hasítjuk. A kapott 5,6 kb méretű HindIII fragmentumot izoláljuk és beépítjük a pUC8 plazmid HindIII klónozó helyére. Így kapjuk a pCHN65 plazmidot.
- (2) A pCHN65 plazmidot EcoRI-gyel hasítjuk és a kapott 2,5 kb fragmentumot, amely a kitináz kódoló szakasz 5' végét tartalmazza, szintén beklónozzuk a pUC8-ba. A keletkezett plazmidot pCHN68 jelzéssel láttuk el.
- (3) A pCHN68 plazmidot PstI-gyel emésztjük és egy 0,5 kb PstI/EcoRI fragmentum kihagyásával újból ligáljuk (önmagával kapcsoljuk össze). A kapott plazmidot pCHN74 jelzéssel láttuk el.
- (4) Hogy a "gén 48" átíratának 5' nem-kódoló szakaszát egy BamHI hasítási hely mögé klónozzuk, a pCHN74 plazmidot először HphI-gyel emésztjük, ezután T4 DNS polimeráz segítségével tompa végekkel látjuk el és végül PstI-gyel hasítjuk. Izoláljuk a HphI/PstI fragmentumot és beépítjük a HincII/PstI-gyel emésztett pUC8 plazmidba [Vieira és Messing (1982)]. Így képződik a pCHN87.

Szekvencia analízis alapján megállapítható, hogy a DNS szekvenciában az utolsó eljárási lépés során az 1/2 HincII hasítási hely egy bázisa elveszett.

(5) A pCHN87-et EcoRI-gyel és HindIII-mal emésztjük és beépítjük a pUC9 klónozó vektorba [Vieira és Messing (1982)].

A kapott plazmidot pCHN88 jelzéssel láttuk el.

(6) A dohány cDNS klón 48 (pCHN48) 1 kb PstI fragmentumát beépítjük a pUC8 plazmid PstI klónozó helyére, s így kapjuk a pCHN78-at.

(7) A pCHN78 plazmid PstI inszertumát a plazmid PstI restrikciós enzimmel való hasításával felszabadítjuk és beépítjük a pCHN88 PstI helyére, ezáltal újból helyreállítottuk a komplett, kitináz kódoló DNS szekvenciát. A kapott plazmidot pCHN89 jelzéssel láttuk el.

(8) Ezt követően a pCHN89 plazmidot BamHI-gyel teljesen és PstI-gyel részlegesen emésztjük. A kapott 1,5 kb fragmentumot beklónozzuk a pGY1 növényi expressziós vektorba, amelyet előzőleg BamHI-gyel és PstI-gyel szintén hasítottunk. Így jutunk a pSCH10-hez. E klónozási lépés révén a kitináz kódoló DNS szekvenciát a CaMV promotor és a CaMV terminációs szekvencia közé iktattuk be.

13. példa: A kitináz mutánsok beépítése a pSCH10 növényi
expressziós vektorba

13.1 A dohány kitináz mutánsok beépítése

A pSCH10 plazmid PstI fragmentumát a következő PstI fragmentumokkal cseréltük ki:

pTUCH6 eredetű PstI fragmentum → pSCM3
pTUCH7 eredetű PstI fragmentum → pSCM25
pTUCH8 eredetű PstI fragmentum → pSCM22
pTUCH9 eredetű PstI fragmentum → pSCM23
pTUCH10 eredetű PstI fragmentum → pSCM24

E plazmidok már mutált 3'-terminális "targeting"-szekvenciákat tartalmaznak, s a következő nukleotid szekvenciákkal rendelkeznek:

pSCH10: 5'- GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT AGT TAA -3'
pSCM24: 5'- GGA AAA GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA -3'
pSCM22: 5'- GGA AAT GGA CTT TTA GTC AAT ACT ATG TAA -3'
pSCM23: 5'- GGA AAT GGA CTT TTA GTC CGT ACT ATG TAA -3'

A vad típusu plazmiddal (pSCH10) szemben megváltoztatott (mutált) nukleotidokat vastag betűvel irtuk és aláhúztuk.

13.2 Az uborka kitináz mutánsok beépítése

13.2.1 pSCU1 plazmid

A pSCM1 plazmid EcoRI/BclI fragmentumát és a pTUCU4 BamHI/EcoRI fragmentumát beklónozzuk az előzőleg EcoRI-gyel hasított pTZ18U plazmidba. Így keletkezik a pTUCU7 plazmid.

A pTUCU7 plazmid EcoRI/NdiI fragmentumát és a pTUCU6 NsiI/EcoRI fragmentumát beklónozzuk az előzőleg EcoRI-gyel hasított pTZ18U plazmidba. Így kapjuk a pTUCU11 plazmidot.

Ezután a pTUCU11 plazmidot BamHI-gyel és XbaI-gyel emésztjük és izoláljuk a BamHI/XbaI fragmentumot. Ezt ezután beépítjük az előzőleg BamHI/XbaI-gyel hasított pGY1 plazmidba. Így kapjuk a pSCU1 plazmidot.

13.2.2_pSCU3_plazmid

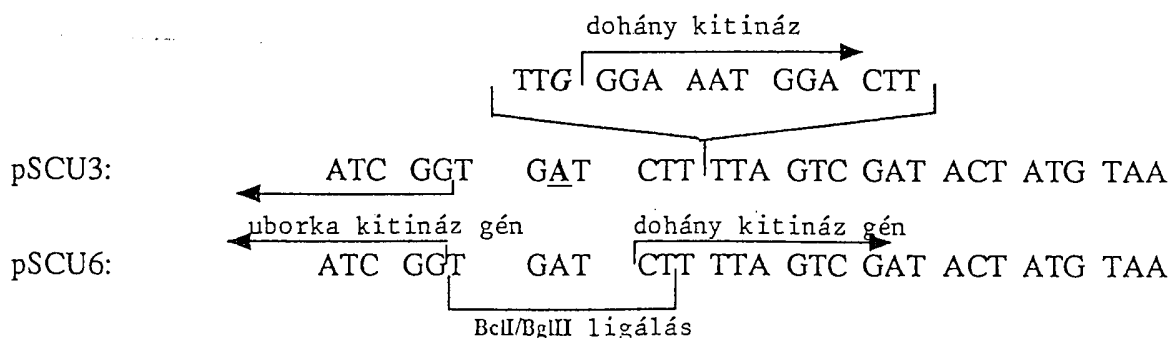
A pTUCU7 plazmid EcoRI/NsiI fragmentumát és a pTUCU5 NsiIII/EcoRI fragmentumát ezután beklónozzuk az előzőleg EcoRI-gyel hasított pTZ18U plazmidba. Így jutunk a pTUCU10 plazmidhoz.

A pSCU3 plazmidot úgy állítjuk elő, hogy a pTUCU10 plazmid XhoI/BclI fragmentumát és a pTUCU7 plazmid BglII/PstI fragmentumát az előzőleg XhoI/PstI-gyel hasított pGY1 plazmidba klónozzuk be.

13.2.3_pSCU6_plazmid

A pTUCU10 XhoI/BclI fragmentumát és a pTUCU10 BglII/PstI fragmentumát az előzőleg XhoI/PstI-gyel hasított pGY1-be klónozzuk be, s így jutunk a pSCU6 plazmidhoz.

Ellentétben a pSCU1 kontroll plazmiddal, a pSCU3 és pSCU6 plazmidok most már tartalmazzák a 3'-terminális "targeting"-szekvenciákat, amelyek a következő nukleotid szekvenciákból (5'→3') állnak:



A vadtypushoz képest megváltoztatott (mutált) nukleotidokat vastag betűvel írtuk és aláhúztuk.

Az inszertálás révén ujonnan bevitt nukleotidokat dőlt betűvel írtuk.

14. példa: A pSCM- és pSCU-szerkezetek beépítése biner növényi vektorba

14.1 A pCIB200 plazmid szerkesztése

E biner vektort a Schmidhauser és Helinski (1985) által leírt pTJS75 plazmidból kiindulva szerkesztettünk meg. A pTJS75 az RK2 [G. An és mtsai (1985)] egy származéka, amely széles gazda-kört ölel fel és egy tetraciklin rezisztencia gént tartalmaz. Ezt a plazmidot NarI restrikciós enzimmel hasítjuk és ezt követően összekapcsoljuk az NptI gént tartalmazó pUC4K AccI fragmentumával [Vieira és Messing (1982)]. Az ilyen módon készített pTJS75kan plazmidot, amely a tetraciklin rezisztencia gén mellett már az nptI gént is tartalmazza, SalI restrikciós enzimmel emésztjük.

Ugyanekkor a Rothstein és mtsai (1987) által leírt pCIB7 plazmidot EcoRV-tel hasítjuk és a kapott EcoRV fragmentumot, amely az Agrobacterium tumefaciens Ti-plazmidjából származó jobb és bal T-DNS határ-szekvenciákat, valamint egy kiméris/nptII gént és a pUC polilinker szakaszt tartalmazza, XhoI linkerrel kapcsoljuk össze.

A kapott szerkezetet ezután XhoI-gyel emésztjük és beklónozzuk a pTJS75kan plazmid SalI helyére. A kapott plazmidot, amelynek a géntérképét az 1. ábrán mutatjuk be, pCIB200 jelzéssel láttuk el.

14.2 Az EcoRI fragmentumok klónozása pCIB200-ban

A pCIB200 plazmidot először EcoRI-gyel hasítjuk. Ezt követően a következő EcoRI fragmentumokat a hasított pCIB200-ba klónozzuk be:

A pSCH10 plazmid EcoRI fragmentuma → pSCH12

A pSCM3 plazmid EcoRI fragmentuma → pSCM13

A pSCU1 plazmid EcoRI fragmentuma → pSCU11

A pSCU3 plazmid EcoRI fragmentuma → pSCU13

IV. TRANSZFORMÁLÁS DOHÁNY PROTOPLASZTOKBAN

Az előzőekben leírt plazmidokat in vitro *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztokban vizsgáltuk "Transient Expression System" alkalmazásával.

15. példa: *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztok előállítása és tenyésztése

A *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztok előállítása és tenyésztése általánosan ismert eljárásokkal történik, hasonlóan a dohányra leírt (lásd a 3. példát) eljáráshoz. Részletes leírás található Shillito és Potrykus (1987) vagy Negrutiu és mtsai (1987) közleményeiben.

16. példa: A protoplasztok transzformálása

A *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztok transzformálását a Negrutiu és mtsai (1987) által leírt eljárás szerint végeztük.

A fenti eljárással előállított protoplasztokat az utolsó tisztítási lépés után a következő összetételű oldatban szuszpendáljuk:

Mannit	0,4 M
CaCl ₂	15 - 30 mM
MES	0,1 % (tömeg/térf)

A protoplaszt szuszpenzió sűrűsége $1,6-2 \cdot 10^6$ /ml.

Ezután 3 ml protoplaszt szuszpenziót - 15 ml-es centrifugacsőben - 5 µg plazmid-DNS steril vizes szuszpenziójával elegyítjük [Paszkowski és mtsai (1984)]. Néhány perccel később ehhez az elegyhez 0,3 ml polietilén-glikol oldatot [40 % (tömeg/térf) PEG 6000 0,4 M mannit és 0,1 M Ca(NO₃)₂ (pH=7,0) tartalmú oldatban] adunk és az elegyet óvatosan összekeverjük. Néhány perccel ezután 4 ml K3 oldatot adunk hozzá [Z. Pflanzenphysiol, 78, 453-455 (1976); Shillito és mtsai (1981)] és a csöveket 24 órán át sötétben 25-27°C-on inkubáljuk.

A protoplasztok ülepedőképességének a javítása céljából ezt követően W5-sóoldatot [Negrutiu és mtsai (1987)] (5,4 ml) adhatunk az elegyhez. Ezután a protoplasztokat kis sebességgel (körülbelül 60-100 g) lecentrifugáljuk. A felüluszó egy részét kivesszük a kitináz aktivitás későbbi vizsgálatára céljából, a maradékot pedig eldobjuk. Az elválasztott protoplasztokat a maradék táptalajban reszuszpendáljuk, átvisszük Eppendorf csövekbe, ahol közelítőleg meghatározzuk a térfogatát. A szuszpenzió alikvot mennyiségeit használjuk fel a kitináz aktivitás vizsgálatára, valamint a Western blot analízishez.

A *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztok transzformálását a pCIB1005B és pCIB1005B ΔVTP plazmidokkal a Goodall és

mtsai (1990) által módosított "Negrutin"-eljárással is el lehet végezni.

V. TRANSZGENIKUS NÖVÉNYEK TRANSZFORMÁLÁSA ÉS ELŐÁLLÍTÁSA

17.1 példa: *Agrobacterium tumefaciens* transzformálása biner vektorokkal

A 14. példában fent leírt biner vektorokkal az *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 törzset a következő eljárással transzformáljuk. Az *A. tumefaciens* LBA4404 olyan deletált Ti plazmidot tartalmaz, amelyből hiányzik a T-DNS szakasz, azonban mindelőzőleg, egy érintetlen vir-szakasszal rendelkezik [Hoekema és tsai (1983)].

Az *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 törzset 30°C-on 5 ml MG/L táptalajban (lásd a VII. fejezetet) egy éjszakán át tenyésztjük. Ezen egy éjszakás tenyészet 5 ml-éhez ezután 250 ml MG/L táptalajt adunk és az egész elegyet jól elkeverjük, míg az OD = 0,6 optikai sűrűséget (600 nm-en) el nem érjük. Ezután a sejteket centrifugálással gyűjtjük össze, majd 5 ml MG/L táptalajban reszuszpendáljuk. A sejt-szuszpenzió 200 µl-ét 0,2-1 µg biner plazmid DNS-sel, MG/L táptalajban inkubáljuk, amikor is az elegyet enyhe átkeverés után azonnal egy szárazjég/etanolos fürdőben mélyfagyasztjuk. A csöveket 5 perc múlva 37°C-os vízfürdőbe helyezzük és 5 percig benne hagyjuk. Ezután 2 ml MG/L táptalajt adunk hozzá. A szuszpenziót ezután 2-3 órán át 30°C-os víz-

fürdőben inkubáljuk, majd a sejteket centrifugálással gyűjtjük össze. A sejteket kevés MG/L táptalajban reszuszpendáljuk, majd szelektív táptalajra (MG/L lemezek, 100 μ g/ml gentamicinnel) szelészttjük. A lemezeket 30°C-on tartjuk, amelyeken 2-3 nap múlva jelennek meg az első telepek.

17.2 példa: *Agrobacterium tumefaciens* transzformálása biner vektorokkal

Egy másik kiviteli mód szerint a 14. példában fent leirt biner vektorokat triparentális keresztezéssel [S.G.Rogers és mtsai (1986)], egy tra-funkcióju plazmidot tartalmazó *E.coli* segítő törzs alkalmazásával, az *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe visszük be. *E.coli* segítő törzs gyanánt például az *E.coli* BHB 1011-et alkalmazhatjuk, amely a biner vektorok átviteléhez szükséges tra-funkciókkal rendelkező pRK2013 plazmidot tartalmazza.

Az *A.tumefaciens* LBA4404 sejteket egy éjszakán át 28°C-on, 20 mg/l rifampicinnel és 500 mg/l sztreptomocinnel kiegészített LB táptalajban tenyészttjük.

Az *E.coli* BHB1011 sejteket és a biner vektorokat tartalmazó *E.coli* törzseket egy éjszakán át 37°C-on 25 mg/l kanamincint tartalmazó LB táptalajban tenyészttjük.

A tenyészetek 1-1 ml-ét 8000 g mellett lecentrifugáljuk, 1 ml steril vízzel vagy 10 mM $MgSO_4$ tartalmú oldattal mosuk, újból lecentrifugáljuk és 100 μ l vízben vagy $MgSO_4$ oldatban reszuszpendáljuk. Egy LB szilárd táptalajt tartalmazó le-

mezt négy szektorra osztunk. Ezekbe a szektorokba a három baktérium-tenyészet cseppjeit úgy visszük fel, hogy a négy szektorból háromban két-két tenyészet lehetséges kombináció legyen együtt. Ezek kontrollként szolgálnak. A negyedik szektorban ezzel szemben mind a három tenyészetet elegyítjük. A cseppek megszárítása után a lemezeket 28°C-on egy éjszakán át inkubáljuk. Ezután minden szektorból mintát veszünk és vízben vagy MgSO_4 oldatban reszuszpendáljuk. Ezekből a szuszpenziókból higitásokat készítünk és 20 mg/l rifampicint, 500 mg/l sztreptomomicint és 25 mg/l kanamicint tartalmazó LB-lemezekre szélesztjük, ahol 2-3 napig körülbelül 28°C-on inkubáljuk. Azokat a telegeket, amelyek a triparentális keresztezés nagy higitása esetén növekednek (a kontroll keresztezések hasonló higitásai esetében semmilyen növekedés nem lehet), ismételt szélesztéssel a még esetleg jelenlévő szülő-baktériumoktól megszabadítják.

18. példa: *N.sylvestris* és *N.tabacum* levél-korong ("leaf-disc")
transzformálása

A levél-korong transzformációt lényegében a Horsch és Mtsai (1985) által leírt eljárás szerint végezzük.

A.tumefaciens LBA4404 sejteket (pCIB200; pSCH12; pSCM13; pSCU11; pSCU13) 20 mg/l rifampicinnel, 500 mg/l sztreptomomicinnel és 25 mg/l kanamicinnel kiegészített és pH=5,6-ra beállított glutamát-só táptalajban tenyésztünk egy éjszakán át 28°C hőmérsékleten. Ezekben az egy éjszakai tenyészetekben, amelyek körülbelül $3,3 \cdot 10^8$ sejtet tartalmaznak, *N.sylvestris* vagy

N.tabacum cv. Havana 425 növényből származó steril levél-korongokat (átmérő: 5-10 mm) inkubálunk 5 percen át. Ezután a korongokat kivesszük a tenyészetből és steril papírzsebkendőkre helyezve leitatjuk. A korongokat ezután táptalajt tartalmazó 100 mm átmérőjű Petri-csészékbe visszük át.

Az említett táptalaj 1 % agart (DIFCO) tartalmazó szilárd, Linsmeier és Skoog (1965) szerinti alaptáptalaj (30 ml), amely még pH indikátort (5 mg/l klór-fenolvörös), valamint növényi növekedési hatóanyagként kinetint (0,3 mg/l) és α -naftil-ecetsavat (2 mg/l tartalmaz. Az agar táptalajra (A táptalaj) a N. tabacum cv. Havana 425 [Eichholz és mtsai (1983)] bélszövetéből származó S275N sejtek 2 hetes szuszpenzió-tenyészetéből 1-2 ml-t rétegezzük, majd lefedjük szűrőpapírral (#1 Whatman szűrőpapír). Ezután erre a szűrőpapírra helyezzük a levél-korongokat.

Negyvennyolc óra múlva az explantátumokat a hajtás indukciója céljából azonos összetételű szelektív táptalajra helyezzük, amely még 350 mg/l cefotaximot, 100 mg/l kanamicint is tartalmaz (B táptalaj) és 25°C-on, diffúz fényben (80-100 μ Einstein) inkubáljuk. Az együtt tenyésztett kontroll szöveteket azonos, de kanamicint nem tartalmazó táptalajra oltjuk. Az explantátumokat hetenként friss B táptalajra visszük át.

A 4-8 hetes együtt-tenyésztés után az explantátumokból kifejlődött hajtásokat learatjuk és 25 ml C táptalajt (0,6 % Phytagar tartalmu szilárd táptalaj) tartalmazó 50 ml-es edényekbe visszük át. A teljes szövetet 24-28°C-on, 80-100 μ Ein-

stein erősségű megvilágítás mellett tenyésztjük. A hajtások 1-2 hét múlva gyökeresednek meg.

VI. A TRANSZGENIKUS NÖVÉNYI ANYAGOK VIZSGÁLATA

(A) A vakuólákban való elhelyezkedés közvetett vizsgálata.

19. példa: A transzformált protoplasztok vizsgálata

A transzformált protoplasztok vizsgálatát a 17. és a 20.3. példában leírt eljárások szerint végezzük.

19.1 Kitináz aktivitás

Az 1. táblázat aktivitás adataiból látható, hogy a kontroll protoplasztok jóllehet tartalmazznak endogén kitináz aktivitást, azonban a felülszóban csak csekély aktivitást lehet kimutatni.

Ezzel ellentétben minden dohány-kitináz szerkezet jelentősen magasabb össz-aktivitást mutat mind az üledékben, mind a felülszóban. Minden vizsgált felülszó mintában az összes megemelkedett kitináz aktivitás valószínűleg a celluláris szortirozó rendszer túlterhelésére vezethető vissza. Mégis jelentős eltérések észlelhetők:

A pSCH10, pSCM22, pSCM23 és pSCM24 szerkezetek esetében az üledékben a kitináz aktivitás 3-4-szer magasabb, mint a kontrollokban mért aktivitások. A pSCM3 szerkezet esetén ezzel szemben az üledékben a kitináz aktivitás csak 35 %-kal magasabb.

A pSCU1, pSCU3 és pSCU6 uborka-kitináz szerkezetek esetében az üledékben csak 10-20 %-kal magasabb kitináz aktivitás mér-

hető, míg a felülszóban az aktivitás 7-8-szor (illetve a pSCU3-nál 4-szer) magasabb, összehasonlítva a kontrolléval.

Az 1. táblázat eredményeit megerősítik a Western blot vizsgálat eredményei. Az uborka kitináz Western blot adatai például világosan mutatják, hogy amíg a pSCU1 (vad-típus) esetében a transzformált protoplasztokban csak nagyon kevés kitináz van, addig a pSCU3-mal és pSCU6-tal transzformált protoplasztokban igen magas a kitináz koncentráció.

19.2 Glükanáz aktivitás

A kontroll protoplasztokkal elért eredmények (lásd a 10. táblázatot) mutatják, hogy a *Nicotiana plumbaginifolia*-ból származó β -1,3-glükanáz a sejtekben visszamarad.

Ezzel összehasonlítható eredmény érhető el az ép szerkezet (pCIB1005B) alkalmazásával, mely esetben a protoplaszt kivonatokban csak egy erősebb szignál figyelhető meg. Ez azt mutatja, hogy a dohány-glükanázt is visszatartják a protoplasztok és így helyesen a celluláris kompartmentumba irányítódik. Ezzel szemben a deletált, illetve inaktivált C-terminális szakaszt tartalmazó szerkezet (pCIB1005B Δ VTP) alkalmazásakor a β -1,3-glükanáz a táptalajba szecernálódik.

20. példa: A transzformált növények vizsgálata

A 18. példa szerint transzformált növényeket a következőkben leírt eljárással vizsgáljuk.

20.1 Az intercelluláris folyadék (CF) extrakciója

Növényi szövetekből az intercelluláris folyadékot a Parent és Asselin (1984) által leírt módszerrel extrahálhatjuk.

Ekkor úgy járunk el, hogy először leveleket gyűjtünk a regenerált transzgenikus növényekről és 4-5 cm²-es darabokra vágjuk. A leveleket ezután vákuumban 30-30 másodpercig enyhe rázás közben nagy feleslegben lévő hideg (körülbelül 4°C-os) pufferrel átítatjuk. Az említett puffer előnyösen a következő összetételű:

Trisz.HCl (pH=7,8) 0,5 M szaccharózzal	25,0 mM
MgCl ₂	10,0 mM
CaCl ₂	10,0 mM
Fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF)	0,5 mM
2-merkapto-etanol	0,5 mM

Más megoldásként 50 mmólos citrát-puffer (pH=5,5) is alkalmazható. Szobahőmérsékleten is lehet dolgozni.

A vákuum megszüntetése után a puffer behatol a levelekbe. Ezután a levél-darabkákat gondosan megszárítjuk és 20 ml-es fecskendőben helyezzük el. A fecskendőt egy centrifuga-csőbe akasztjuk be és 10 percen át kis sebességgel (körülbelül 1.000 g) és alacsony hőmérsékleten (4°C) centrifugáljuk.

20.2 Az intracelluláris protein frakció extrakciója

A 20.1 példában leírtak szerint kezelt levél-darabkákat ezután ugyanabban a pufferben homogenizáljuk. A durva részecskéket centrifugálással választjuk el.

20.3 A kitináz aktivitás meghatározása

A két kivonat protein koncentrációját a BIORAD féle Protein Assay segítségével határozzuk meg, amely a Bradford-eljárás alapul. Ennek lényege egy színezék színének a megváltozása a protein koncentrációtól függő mértékben.

A kitináz aktivitást radiometriás vizsgálattal, radioaktiv jelzett (tríciumozott) kitin alkalmazásával határozzuk meg [Boller és mtsai (1983)]. A dohány kitináz transzformátumok eredményeit a 2. táblázatban, az uborka kitináz transzformátumok eredményeit a 3. táblázatban adjuk meg. A protoplasztokkal és egész növényekkel végrehajtott transzformációs kísérletek eredményeiből összefoglalva meg lehet állapítani, hogy a dohányból származó bázikus kitináz C-terminális végén lévő találmány szerinti peptid fragmentum a felelős a kitináznak a növényi vakuólába való bejuttatásáért.

A pSCM22-vel, pSCM23-mal és pSCM24-gyel kapott eredmények azt mutatják, hogy az aminosav szekvencián belül, C-terminális végén, bizonyos variáció megengedett anélkül, hogy a szekvencia "targeting" funkciója elveszne. Ha hiányzik a 3'-terminális "targeting"-szekvencia (pSCM3; pSCM13), akkor az egyébként a vakuólákban lévő kitináz egy nagy része az extracelluláris térbe szecernálódik.

Továbbá, az előbbi eredmények alapján látható, hogy a találmány szerinti DNS szekvencia egy heterológ génnel (uborka kitináz gén; pSCU3; pSCU6; pSCU13) mesterségesen összekapcsolva "targeting"-szignálként funkcionál, vagyis a természetes módon szecernálódó kitináz protein a növényi sejtekben, és itt

nagy valószínűséggel a vakuólán belül marad.

(B) A vakuólákban való elhelyezkedés közvetlen kimutatása

21.1. példa: Protoplaszt izolálás

[Adaptálva Müller és mtsai (1983) szerint]

Transzgenikus *N.Sylvestris* növények leveleit 1-1,5 g-os darabokra vágjuk és Petri csészékben K3M oldatba helyezzük. A K3M oldat a K3 makroelemekből fele koncentrációt (1 literben 75 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 450 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1250 mg KNO_3 , 125 mg NH_4NO_3 , 67 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 125 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) és 84 g mannitot tartalmaz (pH= 5,6); az ozmolaritás 500 mOsm-ra van beállítva. Ezután a leveleket keskeny csikokra vágjuk és az ozmotikumban egy órán át inkubáljuk. Ezután a levél-csikokat leitatjuk és tálkákba helyezzük, amelyek mindegyike 10 ml emésztő oldatot tartalmaz. Az emésztő oldat 0,4 % Macerozym R10-et (SERVA) és 0,6 % Cellulysint (CALBIOCHEM) tartalmaz K3M oldatban (a K3M oldat 75,6 g mannitot tartalmaz, hogy az ozmolaritás az enzimekkel együtt ismét 500 mOsm legyen). A Petri csészéket parafilmmel lezárjuk és egy éjszakán át rázatás nélkül 26°C hőmérsékleten, sötétben inkubáljuk. A gyorsabb emésztés elérése céljából a levél-csikokat kétszeres enzim koncentrációt alkalmazva, vákuumban leszűrhetjük és ezután lassu rázatással (30-40 ford/perc) 2-3 órán át inkubálhatjuk.

A protoplasztokat 100 μm pórusu szűrőn szűrjük, s a szűrőt ezután fél-térfogatnyi 0,6 mólos szaccharózzal öblítjük. A

szuszpenziót 15 ml-es centrifugacsövekbe öntjük, rárétegezzünk 2 ml K3M oldatot és 10 percen át 1.000 g-vel centrifugáljuk. A köztes fázisból a protoplasztokat leszívjuk, K3M oldadttal hígítjuk és 10 percen át 700 g-vel centrifugáljuk. Végül a lecentrifugált protoplasztokat K3M-ben ismét reszuszendáljuk.

21.2 példa: A vakuólák izolálása

[Adaptálva Boudet és Alibert (1987) szerint]

A protoplasztokat 20 % Ficoll tartalmu K3M oldatban (pH=6,5) reszuszendáljuk. A szuszpenzióból 2,5 ml-t centrifugacsőbe teszünk és a következő oldatokat rétegezzük rá egymás után: 2 ml 15 %-os Ficoll, 7 mg DEAE-dextrán (pH=6,5); 2 ml 10 %-os Ficoll, 3 mg dextrán-szulfát (pH= 8,0); 2 ml 6 %-os Ficoll, 3 mg dextrán-szulfát (pH=8,0); és körülbelül 4 ml 0 %-os Ficoll (pH=8,0) (peremig). A csöveket kilengő rotoros centrifugában (SW 41.14, Kontron) először 15 percen át 3500 ford/perc mellett, majd 105 percen át 40.000 ford/perc mellett centrifugáljuk. A vakuólákat a 0-6 % Ficoll-os közti fázisból szívjuk le.

A merkereket Boller és Kende (1979) szerint mérjük. A hexóz-foszfát izomeráz méréséhez először ki kell csapni a dextrán-szulfátot DEAE-dextránnal, csak ezután végezhető el a mérés. A protein meghatározás Bradford szerint nem végezhető el, mivel mindkét polibázis zavarja ezt a meghatározást. Az 5. táblázat eredményeit a 100 %-nak vett α -mannozidáz vakuóla-marker enzimhez igazítottuk.

A 4. táblázatban a specifikus kitináz aktivitások össze-

hasonlítása a 2. táblázat eredményeit megerősíti.

A pSCM13, illetve pSCU11 plazmidokkal transzformált M13.4 és U11.4.2 növényeknél kitináz szekréció valósul meg, míg a pSCH12 és pSCU13 plazmidokkal transzformált M10.4 és M13.5 növényeknél az intracelluláris elhelyezkedés egyértelműen kimutatható. A Western blot megerősíti, hogy az endogén *N.sylvestris* kitináza intracellulárisan fordul elő és az M13.4 protoplasztoknál a maradék aktivitás legnagyobb részéért felelős.

Az M10.7.4 és U13.15 növényekből protoplasztokat izoláltunk. A különböző markerek mérése (5. táblázat) megerősítette, hogy azok a kitinázok helyezkednek el vakuolárisan, amelyek C-terminális szekvenciát viselnek. Ezt az elhelyezkedést a Western blot vizsgálat is megerősíti. Az endogén kitináz ugyancsak vakuoláris.

Minden szériából egy vagy több önmegtermékenyített növényből lehetett magot nyerni. Ki tudtuk mutatni, hogy az intenzív kitináz termelés és a mindenkori lokalizáció az utódgenerációban tovább öröklődik.

LETÉTBÉ HELYEZÉS

A Budapesti Egyezmény határozatai szerint, a következő törzseket helyeztük letétbe az "American Type Culture Collection" (Rockville, Maryland, USA) intézménynél:

Plazmid	A letétbe helyezés időpontja	Letéti szám (ATCC)
pBscucchi/chitinase		
(röv.: pBSCucCht5)	1988. dec. 29.	40528
pBSGluc39.1	1988. dec. 29.	40526
pCIB1005B	1990. márc.13.	40770

VII. TÁPTALAJON ÉS PUFFER OLDATOK

"A" táptalaj

NH ₄ NO ₃	1650	mg/l
KNO ₃	1900	mg/l
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	mg/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	mg/l
KH ₂ PO ₄	170	mg/l
Na ₂ EDTA	37.3	mg/l
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.8	mg/l
H ₃ BO ₃	6.2	mg/l
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22.3	mg/l
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8.6	mg/l
KI	0.83	mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.25	mg/l
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025	mg/l
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025	mg/l

Szacharóz	30.0	g/l
Tiamin.HCl	0.400	mg/l
mio-Inozit	100.0	mg/l
Kinetin	0.3	mg/l
α -naftil-ecetsav	2.0	mg/l
Klórphenolvörös	5.0	mg/l
Agar	10.0	g/l

"B" táptalaj

Összetétele megegyezik az "A" táptalajével, de nem tartalmaz α -naftil-ecetsavat és ki van egészítve a következőkkel:

Cefotaxim	500 mg/l
Kanamycin	75 mg/l

"C" táptalaj

Összetétele azonos a "B" táptalajével, de nem tartalmaz kinetint.

MG/L Agrobacterium táptalaj

L-leves (L-broth)	50 %
Mannit-glutamát táptalaj	50 %
[Holsters és mtsai (1978)]	

K3M ozmotikum (500 mOsm; pH= 5,6)

NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	75	mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	450	mg/l
KNO ₃	1250	mg/l
NH ₄ NO ₃	125	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	67	mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	125	mg/l
Mannit	84	g/l

W5-sóoldat

NaCl	154 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	125 mM
KCl	5 mM
Glükóz	5 mM
pH 5.6-6.0	

I. Mosóoldat

Szacharóz	154.0	g/l
MES	0.59	g/l
KNO ₃	250.0	mg/l
NH ₄ NO ₃	25.0	mg/l
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	15.0	mg/l
CaCl ₂ . 2H ₂ O	90.0	mg/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	25.0	mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.4	mg/l

TENP Puffer

TrisHCl (pH 8.0)	100 mM
EDTA	10 mM
NP-40 (Sigma Chem.)	1% (térf/térf)

TBE-Puffer

TrisBorát	89 mM
Bórsav	89 mM
EDTA	2 mM

TE-Puffer

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA	1 mM

SSC

NaCl	1.54 mM
Nátriumcitrát (pH 7.0)	0.154 mM

1. táblázat

Kitináz aktivitás *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztokban
tranzien্স expresszió után

Plazmiď	Felűlűszó		Protoplasztok	
	nkat/elegy	std. elt.	nkat/elegy	std. elt.
-	.07	.01	.81	.04
pGY1	.10	.00	.81	.02
pSCH 10	2.05	.05	2.95	.08
pSCM3	2.10	.09	1.08	.01
pSCM22	1.64	.10	2.59	.04
pSCM23	2.65	.34	2.64	.14
pSCM24	1.55	.03	2.12	.52
pSCU 1	.70	.02	.76	.01
pSCU 3	.38	.02	.87	.05
pSCU 6	.87	.09	.92	.04

2. táblázat

Dohány kitináz aktivitás transzgenikus növényekben

Plazmid		Növ.	Homogenizátum				Intracelluláris folyadék				ICF-ben %
			[protein]		[kitináz]		[protein]		[kitináz]		
			mg/ml	nkat/ml	nkat/mg	nkat/gFW	mg/ml	nkat/ml	nkat/mg	nkat/gFW	
pCIB200	C10		4.00	8.9	2.2	44.3	0.28	3.0	10.5	.6	1 %
pCIB200	C11		1.87	6.7	3.6	33.3	0.18	1.4	8.0	.3	1 %
pSCH12	M10.2		0.30	72.6	245.1	363.1	0.38	127.7	340.0	25.5	7 %
pSCH12	M10.3		0.61	229.2	375.5	1146.1	0.39	41.3	104.6	8.3	1 %
pSCH12	M10.7		2.26	233.2	103.3	1166.2	0.19	39.2	207.3	7.8	1 %
pSCH12	M10.13		2.07	342.6	165.9	1713.1	0.21	108.9	516.1	21.8	1 %
pSCH12	M10.16		2.26	261.5	115.7	1307.7	0.17	43.4	249.7	8.7	1 %
pSCH12	M10.18		1.87	252.2	134.6	1260.8	0.46	46.3	101.3	9.3	1 %
pSCM13	M13.2		0.85	299.2	351.3	1496.2	2.55	2462.1	964.6	492.4	25 %
pSCM13	M13.4		0.89	196.6	221.9	983.2	2.31	1922.0	830.6	384.4	28 %
pSCM13	M13.5		0.64	133.4	209.2	666.8	2.18	1581.5	724.9	316.3	32 %
pSCM13	M13.6		0.60	160.9	270.4	804.6	1.81	1584.9	876.1	317.0	28 %
pSCM13	M13.10		0.44	1.8	4.1	9.1	0.42	42.2	100.5	8.4	48 %

3. táblázat. Uborka-kitináz aktivitás transzgenikus növényekben

Szerk.	Növény	Homogenizátum				ICF			%
		mg/ml	nkat/ml	nkat/mg	nkat/gFW	mg/ml	nkat/ml	nkat/mg	
pCIB200	C10	4.0	.8	.2	.10	.28	3.1	11.2	.28
pCIB200	C11	1.87	.6	.3	.19	.18	.90	4.9	.45
pSCU11	U11.1	3.77	3.4	0.9	.84	.19	39.6	207.4	18.06
pSCU11	U11.2	2.15	2.1	1.0	4.72	.32	39.3	122.4	8.99
pSCU11	U11.3	.83	1.70	2.06	2.59	.20	12.86	63.63	7.50
pSCU11	U11.4		.11		.19		.86		.37
pSCU11	U11.5	.37	1.06	2.89	1.57	.21	11.68	56.41	4.92
pSCU13	U13.1	1.98	4.5	2.3	2.75	.18	4.2	23.0	.48
pSCU13	U13.2	.49	2.19	4.50	3.71	.29	4.94	17.01	2.01
pSCU13	U13.3	.48	5.79	12.12	9.53	.19	1.27	6.82	.69
pSCU13	U13.5	3.85	17.8	4.6	2.64	.20	2.5	12.0	.43
pSCU13	U13.15	1.98	.67	.34	1.35	.13	1.10	8.19	.22

4. táblázat. Kitináz aktivitás transzgenikus növények protoplasztjaiban

		Homogenizátum				Protoplasztok				% proto- plasztok- ban		
		[Prot.]		[kitin]		[spec. akt.]		[Prot.]			[spec. akt.]	
		mg/ml	nkat/ml	[kitin]	nkat/ml	mg/ml	nkat/ml	mg/ml	nkat/ml			
Plazmid	Növény											
pSCHI2	M10.4	0.98	153	157	0.13	22.6	173.7	111				
pSCM13	M13.4	1.19	183	153	0.23	4.5	19.2	13				
pSCU11	U11.4.2	2.40	10.2 ^a	4.25	2.13	0.23 ^a	0.11	2.6				
pSCU13	U13.15	0.75	24.4 ^a	32.5	0.25	12.0 ^a	48.0	148				

^aEzeket az aktivitásokat 2 µl anti-dohány-kitináz antitestek jelenlétében mértük

5. táblázat

Intracelluláris markerek helyzete intenzív kitináz termelő növényekből származó vakuóla készítményekben

1. kísérlet. C-terminális szekvenciát tartalmazó dohány-
-kitináz helyzete (Növény: M10.7.4.)

Marker	Egység ^a /10 ⁶ protoplaszt	Egység/10 ⁶ vakuóla ^b	Össz % a vakuólákban
α-mannozidáz	89	89	100 %
Dohány-kitináz	66300	75100	113 %
Hexóz-6-foszfát izomeráz	2640	170	6 %
Klorofil	27	< 4,5	<17 %

2. kísérlet. A dohány-kitináz C-terminális szekvenciáját tartalmazó uborkakitináz helyzete (Növény: U13.15)

Marker	Egység ^a /10 ⁶ protoplaszt	Egység/10 ⁶ vakuóla ^b	Össz % a vakuólákban
α-mannozidáz	59	59	100 %
Uborkakitináz	12000	12200	102 %
Hexóz-6-foszfát izomeráz	490	90	18 %
Klorofil	62	<2,2	< 4 %

^a Enzimeknél pkat, klorofilnál ug

^b A számok 100 % α-mannozidázra normalizáltak

6. táblázat

A kanamicin rezisztencia szegregációja önmagával keresztezett transzgenikus növények első utódgenerációjában
(Várható arány: 3 KanR : 1 KanS)

Plazmid	Szülőnövény	KanR	KanS
pCIB200	C2	-	-
	C4	39	11
pSCH12	M10.3	27	12
	M10.7	36	14
	M10.13	39	9
pSCM13	M13.2	37	11
	M13.4	39	14
	M13.7	-	-
	M13.10	24	12
pSCU11	U11.3	33	13
	U11.4	15	39
	U11.5	36	11

7. táblázat

Transzgenikus növények utódainak vizsgálata.

(Csak KanR növényeket vizsgáltunk.)

Koncentráció homogenizált levelekben.

Plazmid	Szülőnövény	Növény	mg/ml	nkat/ml	nkat/mg
pClB200	C2	C2.1	2.77	27.3	9.9
		C2.2	2.23	21.7	9.8
		C2.3	2.01	42.5	21.1
	C4	C4.1	2.88	8.3	2.9
		C4.2	2.82	9.6	3.4
		C4.3	2.15	6.1	2.8
		C4.4	2.66	7.2	2.7
	pSCH12	M10.3	M10.3.1	1.59	243.4
M10.3.2			1.82	179.0	98.3
M10.3.3			2.96	212.4	71.7
M10.3.4			1.80	163.9	91.1
M10.7		M10.7.1	1.92	196.5	102.1
		M10.7.3	1.72	148.2	86.3
		M10.7.4	2.23	112.5	50.5
M10.13		M10.13.1	2.81	283.6	100.8
		M10.13.2	2.52	217.6	86.5
pSCM13	M13.2	M13.2.1	1.43	330.1	231.4
		M13.2.2	1.03	8.5	8.2
		M13.2.3	2.15	65.9	30.7
		M13.2.4	1.15	1.1	.9
	M13.4	M13.4.1	1.78	332.7	186.7
		M13.4.3	2.86	357.8	124.9
		M13.4.5	1.14	11.0	9.7
		M13.4.6	1.64	324.7	198.6
	M13.7	M13.7.3	2.60	259.3	99.9
	M13.10	M13.10.1	1.83	235.1	128.6
		M13.10.2	2.89	153.1	52.9
		M13.10.3	2.53	504.9	199.3

8. táblázat

Transzgenikus növények utódainak vizsgálata
(Csak KanR növényeket vizsgáltunk)

Koncentráció homogenizált levelekben.

Plazmid	Szülőnövény	Növény	mg/ml	nkat/ml	nkat/mg
pCIB200	C2	C2.1	2.77	4.40	1.59
		C2.2	2.23	4.06	1.82
		C2.3	2.01	4.95	2.46
PSCU11	U11.3	U11.3.1	2.52	7.38	2.93
		U11.3.2	2.14	7.69	3.59
	U11.4	U11.4.1	1.87	35.58	19.05
		U11.4.2	1.81	46.75	25.77
	U11.5	U11.5.1	2.30	6.95	3.02
		U11.5.2	2.79	13.88	4.98

A kitináz aktivitás mérése dohány kitinázok elleni
immunglobulinok jelenlétében történt.

9. táblázat. Uborka-kitináz aktivitás transzgenikus Fl-növényekben

	Szülőnöv.	Növény	Homogenizátum				ICF				% ICF-ben
			mg/ml	nkat/ml	nkat/mg	nkat/gFW	mg/ml	nkat/ml	nkat/mg	nkat/gFW	
pCIB200	C4	C4.2	3.11	5.10	1.64	6.80	.10	.50	5.30	.28	74 %
pSCU11	U11.3	U11.3.2	1.49	1.10	.74	2.90	.24	26.67	111.12	18.06	96 %
pSCU11	U11.4	U11.4.1	1.63	13.70	8.40	37.80	.56	19.07	33.99	8.99	66 %
pSCU11	U11.4	U11.4.2	1.58	11.60	7.34	37.10	.31	12.86	41.76	7.50	74 %

10. táblázat

³⁵S-jelzett, érett β -1,3-glükánáz aktivitás *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztokban

Plazmid	Protoplaszt kivonat	Inkubációs táptalaj
----	gyenge	nyom
pCIB1005B	erős	nyom
pCIB1005B VTP	gyenge	gyenge

Szakirodalom jegyzék

- Allen G, "Sequencing of proteins and peptides", in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol 8, eds. TS Work and RH Bordon, Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1981).
- An G et al, EMBO J., 4: 277-284 (1985).
- Birk Y et al, Biochim. Biophys. Acta, 67: 326-328 (1963).
- Bohlmann et al, EMBO J 7: 1559-1565 (1988)
- Boller et al, Planta, 157: 22-31 (1983).
- Boller T und Wiemken A, Ann Rev Plant Physiol, 37: 137-164 (1986)
- Boller T und Kende H, Plant. Physiol. 63: 1123-1132 (1979)
- Boudet AM und Alibert G, Meth. Enzymol. 148: 74-81 (1987)
- Cashmore A, Genetic Engineering of Plants, an Agricultural Perspective, Plenum, New York 1983, Seite 29-38.
- Devereux et al, Nucl. Acids Res., 12: 387-395 (1984).
- Erlich et al, PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification, Stockton Press, New York (1989)
- Eichholz R et al, Planta, 158: 410-415 (1983).
- Facciotti und Pilet, Plant Science Letters, 15: 1-7 (1979).
- Felix G und Meins F Jr, Planta, 164: 423-428 (1985).
- Frank G et al, Cell, 21: 285-294 (1980).
- Gardner RC et al, Nucl. Acids Res., 9: 2871-2888 (1981).
- Garfinkel und Nester, J. Bact., 144: 732-743 (1980).
- Glover DM, DNA cloning, volume 1: a practical approach; DM Glover ed., IRL Press, Oxford and Washington DC, p. 33 (198)
- Goodall G et al, Methods in Enzymology, 181: 148-161 (1990)
- Grimsley NH et al, Nature, 325: 177-179 (1987).
- Gubler U und Hoffman BJ, Gene, 25: 263 (1983).
- Haymes BT et al, Nucleic Acid Hybridisation a Practical Approach, IRL Press, Oxford, England (1985).
- Hilder et al, Nature, 330: 160-163 (1987).
- Hoekema et al, Nature, 303: 179-180 (1983).
- Hohn T et al, in: "Molecular Biology of Plant Tumors", Academic Press, New York, pp. 549-560 (1982).

- Horn et al, Plant Cell Reports, 7: 469-472 (1988).
- Horsch et al, Science, 227: 1229 (1985).
- Howard et al, Planta, 170: 535 (1987).
- Innis et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., New York, 1990
- Lagrimini LM et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 7542, (1987).
- Laurell and McKay, Methods Enzymology, 73: 339-361 (1981).
- Lathe R et al, J. Mol. Bio., 183: 1-12 (1985).
- Linsmeier und Skoog, Physiol. Plant., 18: 101-127 (1965).
- Maniatis et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Matsuoka K and Nakamura K, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 834-838 (1991)
- Maxam and Gilbert, 'Sequencing end-labelled DNA with base-specific chemical cleavage', in: Methods in Enzymology 65: 499-560, Academic Press, New York, London, (1980).
- Meins & Lutz, Differentiation, 15: 1-6 (1979).
- Métraux JP et al, Physiol Mol Plant Pathol, 33: 1-9 (1988).
- Mohnen, "Regulation of Glucanohydrolases in Nicotiana tabacum on the messenger RNA level", Dissertation University of Illinois at Urbana-Champaign, 1985.
- Mohnen et al, EMBO J., 4: 1631-1635 (1985).
- Morelli et al, Nature, 315: 200 (1985).
- Muller JF et al, Physiol. Plant. 57: 35-41 (1983)
- Murashige und Skoog, Physiol. Plant., 15: 473-497 (1962).
- Negrutiu I et al, Plant Mol. Biol., 8: 363-373 (1987).
- Neuhaus et al, Theor. Appl. Genet., 74: 30-36 (1987).
- Parent und Asselin, Can J Bot, Vol 62: 564-569 (1984).
- Paszowski J et al, EMBO J, 3: 2717 (1984).
- Petit et al, Mol. Gen. Genet., 202: 388 (1986).
- Pietrzak et al, Nucl. Acids Res., 14: 5857-5868 (1986).
- Potrykus I and Shillito RD, Methods in Enzymology, Vol 118, Plant Molecular Biology, eds. A and H Weissbach, Academic Press, Orlando, 1986.
- Rhodes et al, Biotechnology, 6: 56-60 (1988).

- Rogers SG et al, Methods in Enzymology, 118: 630-633 (1986).
- Rothstein SJ et al, Gene, 53: 153-161 (1987).
- Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition (1989)
- Sanger et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74: 5463-5467 (1977).
- Schmidhauser und Helinski, J. Bacteriol., 164: 446-455 (1985).
- Schocher RJ et al, Bio/Technology, 4: 1093-1096 (1986).
- Selsted et al, Infection and Immunity, 55: 2281-2286 (1987)
- Shillito et al, Bio Technology, 3: 1099-1103 (1985).
- Shillito RD und Potrykus I, In: Methods in Enzymology, eds. Wu R und Grossman L, Academic Press, Orlando, Florida, Vol. 153: 313-306 (1987).
- Shillito RD et al, Biotechnology, 7: 581-587 (1989).
- Shinshi et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 84: 89-93 (1987).
- Shinshi et al, Planta, 164: 423-428 (1985).
- Shinshi et al, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 85: 5541-5545 (1988).
- Simpson RJ und Nice, Biochem Intl, 8: 787 (1984).
- Southern EM, J. Mol. Biol. 98: 503-517 (1975).
- Spena et al, EMBO J., 4: 2736 (1985).
- Tague BW und Chrispeels MV, J Cell Biol, 105: 1971-1979 (1987).
- Terry et al, J. Biol. Chem. 263: 5745-5751 (1988)
- Vierra und Messing, Gene, 19: 259-268 (1982).
- Wang Y-C et al, Plant Mol. Biol., 11: 433-439 (1988).
- Wang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 9717-9721 (1989)
- Yamada Y et al, Plant Cell Rep, 5: 85-88 (1986) .
- Yanisch-Perron et al, Gene, 33: 103-119 (1985).

WO 89/1 1291

EP-A 0,332,104

WO 86/0 4356

EP-A 0.392,225

WO 88/0 5826

WO 89/0 4371

US-P 4,810,777

SZEKVENCIA JEGYZŐKÖNYVEK

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 1

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 39 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: a genetikai kód degeneráltsága alapján fel-
állított elméleti DNS szekvencia

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős.

CGN/AGR TCN/AGW TTY GGN AAY GGN CTN/TTR TTR/CTN GTN
Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val

GAY ACN ATG TAA
Asp Thr Met Vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 2

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 39 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: *Nicotiana tabacum*

KISÉRLETI EREDETÜ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pCHN48

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met Vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 3

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 39 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS (oligonukleotid-közveti-
tette mutagenézissel mutált)

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: *Nicotiana tabacum*

KISÉRLETI EREDETÜ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pCHN48

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

AGG TCT TTT GGA AAA GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

Arg Ser Phe Gly Lys Asp Leu Leu Val Asp Thr Met vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 4

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 39 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS (oligonukleotid-közveti-
tette mutagenézissel mutált)

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: Nicotiana tabacum

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pCHN48

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC AAT ACT ATG TAA
Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asn Thr Met Vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 5

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 39 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS (oligonukleotid-közveti-
tette mutagenézissel mutált)

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: Nicotiana tabacum

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pCHN48

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC CGT ACT ATG TAA
Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Arg Thr Met vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 6

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 40 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS (oligonukleotid-közveti-
tette mutagenézissel mutált)

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: *Nicotiana tabacum*

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pCHN48

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

A/T GAT CTT TTG GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

Asp Leu Leu Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 7

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 30 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS (oligonukleotid-közveti-
tette mutagenézissel mutált)

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: Nicotiana tabacum/uborka

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pCHN48/pBSCucCht5

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

ATC GGT GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

Ile Gly Asp Leu Leu Val Asp Thr Met vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 8

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 21 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS [a 2-es számú (SEQ ID
NO:2) szekvencia fragmentuma]

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: *Nicotiana tabacum*

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pCHN48

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
Leu Leu Val Asp Thr Met Vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 9

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 24 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS [a 2-es számú (SEQ ID
NO: 2) szekvencia fragmentuma]

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: *Nicotiana tabacum*

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pCHN48

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

Gly Leu Leu Val Asp Thr Met Vég

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 10

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 3850 bázis pár

SZÁLFORMA: kétszálú

TOPOLÓGIA: lineáris

A MOLEKULA JELLEGE: genom DNS

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A SEJTKLÓN NEVE: CHN17 [fág]

TULAJDONSÁGOK: bázikus kitináz gén

GAATTCAATC	AAAATGTGTT	TTGTATATAG	GGTGCAACT	ACTAATATAT	50
TGTTATTTTC	TAAAGACATA	CATGTATACA	TGTAAAATTT	ACCGAACTTT	100
ACGGATGTCG	ATAACCCCTC	TCGATATAGC	ATAGGTCCGC	CTCTGATTTA	150
CGAAGGGACA	CGAGGAAATT	CCTCTATGTA	ATTAGTTTTA	GCAGTTACAC	200
GTAAAGTAT	AAATACATAT	TACTTTACCA	TAGTTAAGAC	CAAACATGTG	250
TATGATTGAC	ATACATCTTG	CATTCATTAA	TTAATTTGAT	TTGATGCGAT	300
TAAATTTTTT	AAGGATAGAG	TTTTTAGTCC	AAGTTGAGCT	AGTGTAAGTC	350
TTATAGTCAA	TTGGACTCTC	TATTACTAGA	TACTATATCA	GTTCAAAAGA	400
CACCAATATT	GTATTTTAAC	AGAAGGAGGC	AAATAAGAAA	TTGCAAATTC	450
TCAATTCTTT	TTAATTATAT	CTAATGAACC	AAAAGGAGGA	AGAGGAGCTA	500
CATATTGGAT	TTATAAATAT	AAAGCTAGCT	GAGGCTCAAA	TAATTGTGGA	550
TGCAATACAA	GCAATTTACT	TAAAACACGA	AACAGAAGAG	GATTTCGGTC	600
AAATATCGAC	ACCTAAGTTT	TGAAATACAT	TACTGAACAA	ATTATGAGAT	650
CATAGACTAG	TAATTTAGGA	TATTATTCTG	TGATTGACTT	GATTTTGCAC	700
ATGAAGAAAC	GTGAACGGCT	TTCTTTTTTAG	GGCTGCCGTA	GAATTGATCA	750
AAACATATCT	CAACATATTA	AAATAGGGTC	TCAACTAAAC	CGGATTCATG	800
CGGAATGAGA	CCCATTTAAA	AGGAGCAGTG	GTTCCATTTC	AAAGAATTAG	850
ATACATTTCT	ACATATTTTT	AATTATGAAA	ATTACTCCTA	TACTAATTTG	900

TGTGGTTTTA	ATCGAATATG	TAAATTTTAT	TTGAAAATAA	AATAAAAAAT	950
CACAGTCCAA	CTTTAATCAT	AACACTCAAA	TTAAATTCAG	CTATCTTTCT	1000
AGGACATAGG	AAACATTATC	AGTGGAAATA	TTATATTATA	TCCATAAGAC	1050
TTTAGCAAAT	CCTATAAGAA	GTCTAAACAT	GTAATTGACT	ACTTTTAGAA	1100
GACGCACTTA	TCTAACCCAA	GAAACACCTG	GCGTAACTCG	AATTTGCTTT	1150
TGCCAAAACC	AAAAGTCTAG	GAATTAAGCT	CCAAATTAAA	GACATAGATT	1200
TTGGCTTACT	TTTTTTCAAA	AAAAAAATAA	AATTAAAAAT	TAAAATATTT	1250
TTTGTTTCATG	TAATTTAATC	AGTTTTTGGG	TGAAATTTTT	TCTTCCACAC	1300
ACAAGATTTT	AACTTTTTTC	CAAATAAAAT	ACACGTCGAA	ACATAAATTC	1350
AAATTTTCAGA	ACTATTTTTTC	AACGTAATTT	TAAAATTTTT	ATTTTCTAGT	1400
TTTAACTAAA	TCTATGTCCT	GATTAAGTCT	CCAGTCTTAA	CTCTTAAAGT	1450
ATTGAAAATA	CATGTTTCGAG	AATTGTCTGG	GATGAAGCTA	AGAGCCGCCA	1500
CTAAGAAAAA	AAATCTAAAA	ATATATAAAA	AGGTAAGAGC	CGCCACATAA	1550
TATATGTAAC	CTGTCGGCGT	AATCTACTGA	ATTAATTTTC	TGGATAAGAA	1600
AGATATGACT	GAGCTCCGGT	TTGCTCATAG	ATTTTGACTT	TACTTTTTTTA	1650
ATTTCTTTTT	GAAAATATTG	TTTGTTTAAT	AAAATATGAT	CATGTTTTAG	1700
AAAAACAAAT	TTCAAAAAAC	TTCAAGTTCC	CAAAGTTGT	ATGTCCAAAC	1750
ACAACTTTCA	AAAATTATTT	TTTAAACAA	CTTTAAAAAC	TTTTTTTTTTA	1800
AATTTTAATT	AAATCTATGT	CCAAACTAGC	CGAAATTCGA	GCCTTGGTTA	1850
TTCAACCAAT	TGATTTGGTC	AGAAAGTCAG	TCCTCTCAAC	AACTAAAATA	1900
GACATTAATT	AAGCCATGTC	TCCAGCATCT	TCCTTAGCAA	TAAATACCTT	1950
GCATTTTACC	AGTTTACTAC	TACATTAAA	ATG AGG CTT	TGT AAA TTC	1997

Met Arg Leu Cys Lys Phe

ACA GCT CTC TCT TCT CTA CTA TTT TCT CTC CTA CTG CTT TCT	2039
Thr Ala Leu Ser Ser Leu Leu Phe Ser Leu Leu Leu Leu Ser	

GCC TCG GCA GAA CAA TGT GGT TCC CAG GCC GGA GGT GCG CGT	2081
Ala Ser Ala Glu Gln Cys Gly Ser Gln Ala Gly Gly Ala Arg	

TGT CCC TCG GGT CTC TGC TGC AGC AAA TTT GGT TGG TGT GGT	2123
Cys Pro Ser Gly Leu Cys Cys Ser Lys Phe Gly Trp Cys Gly	

AAC ACC AAT GAC TAC TGT GGC CCT GGC AAT TGC CAG AGC CAG	2165
Asn Thr Asn Asp Tyr Cys Gly Pro Gly Asn Cys Gln Ser Gln	

TGC CCT GGT GGT CCC ACA CCT ACA CCC CCC ACC CCA CCC GGT	2207
Cys Pro Gly Gly Pro Thr Pro Thr Pro Pro Thr Pro Pro Gly	

GGT GGG GAC CTC GGC AGT ATC ATC TCA AGT TCC ATG TTT GAT 2249
Gly Gly Asp Leu Gly Ser Ile Ile Ser Ser Ser Met Phe Asp

CAG ATG CTT AAG CAT CGC AAC GAT AAT GCA TGC CAA GGA AAG 2291
Gln Met Leu Lys His Arg Asn Asp Asn Ala Cys Gln Gly Lys

GGA TTC TAC AGT TAC AAT GCC TTT ATC AAT GCT GCT CGG TCT 2333
Gly Phe Tyr Ser Tyr Asn Ala Phe Ile Asn Ala Ala Arg Ser

TTT CCT GGC TTT GGT ACC AGT GGC GAT ACC ACT GCC CGT AAA 2375
Phe Pro Gly Phe Gly Thr Ser Gly Asp Thr Thr Ala Arg Lys

AGA GAA ATC GCG GCT TTC TTT GCT CAA ACC TCC CAT GAA ACT 2417
Arg Glu Ile Ala Ala Phe Phe Ala Gln Thr Ser His Glu Thr

ACT GGT AAGTCTAGTT ACGTTGAACT ATATGATCGT CTTATTCAAA 2463
Thr Gly

AGTTTAATCA ATTAGAGAGA TCATACTTTT ATTTAATCAT ACTGGTCTAT 2513
TCTGATTTC A TGAGACAAAC ACATAGAACT TCCTTTTAAA ATGATTGCGC 2563
TGAGACTTGA ATTCAGGACC TCTATCTGCT CATCACTGGA GTATCCAATT 2613
TTGAGATATC ACAATGCTTC TTAAATTTTCG AAGTTTTTTA TAAGCTGACG 2663
CGTTCAATAA TTGACCATGT AACCGTTGAC AGGA GGA TGG GCA ACA 2709
Gly Trp Ala Thr

GCA CCA GAT GGT CCA TAT GCA TGG GGT TAT TGC TGG CTT AGA 2751
Ala Pro Asp Gly Pro Tyr Ala Trp Gly Tyr Cys Trp Leu Arg

GAA CAA GGT AGC CCC GGC GAC TAC TGT ACC CCA AGT GGT CAG 2793
Glu Gln Gly Ser Pro Gly Asp Tyr Cys Thr Pro Ser Gly Gln

TGG CCT TGT GCT CCT GGT CGA AAA TAT TTC GGA CGA GGC CCC 2835
Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro

ATC CAA ATT TCA CAG TAAGTTCCTT CTTACCCACA CGGAGTGTTT 2880
Ile Gln Ile Ser His

ACACCAAAGT	CGTGGGACGG	AATGCTTACT	ACCTACTATA	TATTTTCATTG	2930
TGAGAGTAGG	TACACAATAT	CATGATATTT	CTATGATTAT	AAGAGTATGT	2980
GATTAATTTT	TATGAGAAGT	GTAAAGTTAA	ATAGTTTCCA	CAACACAAAA	3030
AAAATGTCAT	TTTTTTAACA	GATTAAAAAA	GAAAAAGTAT	ATGATGAACT	3080
TGTAGGATCT	AATTAAGTGT	ATTTTGACAT	AAATACAGC	AAC TAT AAC	3128
				Asn Tyr Asn	
TAC GGG CCT	TGT GGA AGA	GCC ATA GGA	GTG GAC CTG	CTA AAC	3170
Tyr Gly Pro	Cys Gly Arg	Ala Ile Gly	Val Asp Leu	Leu Asn	
AAT CCT GAT	TTA GTG GCC	ACA GAT CCA	GTC ATC TCA	TTT AAG	3212
Asn Pro Asp	Leu Val Ala	Thr Asp Pro	Val Ile Ser	Phe Lys	
TCA GCT CTC	TGG TTC TGG	ATG ACT CCT	CAA TCA CCA	AAA CCT	3254
Ser Ala Leu	Trp Phe Trp	Met Thr Pro	Gln Ser Pro	Lys Pro	
TCT TGC CAC	GAT GTC ATC	ATC GGA AGA	TGG CAG CCA	TCA GCT	3296
Ser Cys His	Asp Val Ile	Ile Gly Arg	Trp Gln Pro	Ser Ala	
GGT GAT CGC	GCA GCC AAT	CGC CTC CCT	GGA TTT GGC	GTC ATC	3338
Gly Asp Arg	Ala Ala Asn	Arg Leu Pro	Gly Phe Gly	Val Ile	
ACA AAC ATC	ATC AAT GGT	GGC TTG GAA	TGT GGT CGT	GGC ACT	3380
Thr Asn Ile	Ile Asn Gly	Gly Leu Glu	Cys Gly Arg	Gly Thr	
GAC TCA AGG	GTC CAG GAT	CGC ATT GGG	TTT TAC AGG	AGG TAT	3422
Asp Ser Arg	Val Gln Asp	Arg Ile Gly	Phe Tyr Arg	Arg Tyr	
TGC AGT ATT	CTT GGA GTT	AGT CCT GGT	GAC AAT CTG	GAT TGC	3464
Cys Ser Ile	Leu Gly Val	Ser Pro Gly	Asp Asn Leu	Asp Cys	
GGC AAC CAG	AGG TCT TTT	GGA AAT GGA	CTT TTA GTC	GAT ACT	3506
Gly Asn Gln	Arg Ser Phe	Gly Asn Gly	Leu Leu Val	Asp Thr	
ATG TAATTT	CATG ATCTG	TTTTTG TTGTAT	TCCC TTGCAAT	GCA	3549
Met					

GGGCCTAGGG	CTATGAATAA	AGTTAATGTG	TGAATGTGAA	TGTGTGATTG	3599
TGACCTGAAG	GGATCACGAC	TATAATCGTT	TATAATAAAC	AAAGACTTTG	3649
TCCCAATATA	TGTGTTAATG	AGCATTACTG	TAGTTGGTTT	AATTCGGCAC	3699
CAGATAAATA	GATAACCACC	CGCACTATTA	TATTTCATTA	TTTAGAAAAC	3749
CGAGATCTTT	ATTTGAGTGA	ATGAAAATCT	TCCTAACCAG	ATAGTCATAC	3799
TAATCAGTCA	AAAAAAAATC	TAACCTCAAA	ATTTAAGCAT	CCGAGCTGCAG	3850

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 11

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia

A SZEKVENCIA HOSSZA: 1103 bázis pár

SZÁLFORMA: kétszálú

TOPOLOGIA: lineáris

A MOLEKULA JELLEGE: cDNS

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: TNV-vel fertőzött uborka levelek

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pBSCucCht5 [ATCC 40528]

TULAJDONSÁGOK: savanyu kitináz gén

AAAGAAAGCT	CTTTAAGCAA	TGGCTGCCCCA	CAAAATAACT	ACAACCCTTT	50
CCATCTTCTT	CCTCCTTTCC	TCTATTTTCC	GCTCTTCCGA	CGCGGCTGGA	100
ATCGCCATCT	ATTGGGGTCA	AAACGGCAAC	GAGGGCTCTC	TTGCATCCAC	150
CTGCGCAACT	GGAAACTACG	AGTTCGTCAA	CATAGCATTT	CTCTCATCCT	200
TTGGCAGCGG	TCAAGCTCCA	GTTCTCAACC	TTGCTGGTCA	CTGCAACCCT	250
GACAACAACG	GTTGCGCTTT	TTTGAGCGAC	GAAATAAACT	CTTGCAAAAG	300
TCAAAATGTC	AAGGTCCTCC	TCTCTATCGG	TGGTGCGCGG	GGGAGTTATT	350
CACTCTCCTC	CGCCGACGAT	GCGAAACAAG	TCGCAAACCT	CATTTGGAAC	400
AGCTACCTTG	GCGGGCAGTC	GGATTCCAGG	CCACTTGGCG	CTGCGGTTTT	450
GGATGGCGTT	GATTTGATA	TCGAGTCTGG	CTCGGGCCAG	TTCTGGGACG	500
TACTAGCTCA	GGAGCTAAAG	AATTTTGGAC	AAGTCATTTT	ATCTGCCGCG	550
CCGCAGTGTC	CAATACCAGA	CGCTCACCTA	GACGCCGCGA	TCAAAACTGG	600
ACTGTTTCGAT	TCCGTTTGGG	TTCAATTCTA	CAACAACCCG	CCATGCATGT	650
TTGCAGATAA	CGCGGACAAT	CTCCTGAGTT	CATGGAATCA	GTGGACGGCG	700
TTTCCGACAT	CGAAGCTTTA	CATGGGATTG	CCAGCGGCAC	GGGAGGCAGC	750
GCCGAGCGGG	GGATTTATTC	CGGCGGATGT	GCTTATTTCT	CAAGTTCTTC	800
CAACCATTAA	AGCTTCTTCC	AACTATGGAG	GAGTGATGTT	ATGGAGTAAG	850

GCGTTTGACA ATGGCTACAG CGATTCCATT AAAGGCAGCA TCGGCTGAAG	900
GAAGCTCCTA AGTTTAATTT TAATTAAAGC TATGAATAAA CTCCAAAGTA	950
TTATAATAAT TAAAAAGTGA GACTTCATCT TCTCCATTTA GTCTCATATT	1000
AAATTAGTGT GATGCAATAA TTAATATCCT TTTTTCATT ACTATACTAC	1050
CAATGTTTTA GAATTGAAAA GTTGATGTCA ATAAAAACAT TCCAAGTTTA	1100
TTT	1103

A SZEKVENCIA SZÁMA (SEQ ID NO): 12

A SZEKVENCIA JELLEGE: nukleotid szekvencia a megfelelő peptid
szekvenciával

A SZEKVENCIA HOSSZA: 69 bázis pár

A MOLEKULA JELLEGE: mRNS eredetű cDNS

EREDETI SZÁRMAZÁS

SZERVEZET: *Nicotiana tabacum*

KISÉRLETI EREDETŰ KÖZVETLEN SZÁRMAZÁS

A KLÓN NEVE: pBS - Gluc39.1 [ATCC 40526; ismertetve
az EP-A 0,332,104 számú európai szabadal-
mi bejelentésben]

TULAJDONSÁGOK: kódolt szignál-peptid, amely asszociált protein
molekulák vakuoláris elhelyezkedéséért felelős

GTC TCT GGT GGA GTT TGG GAC AGT TCA GTT GAA ACT AAT GCT ACT
Val Ser Gly Gly Val Trp Asp Ser Ser Val Glu Thr Asn Ala Thr

GCT TCT CTC GTA AGT GAG ATG TGA
Ala Ser Leu Val Ser Glu Met Vég

Szabadalmi igénypontok

1. DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy egy rövid peptid fragmentumot kódol, amely egy tetszőleges, asszociált génterméknek a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős.
2. Az 1. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az említett szekvenciát egy olyan gén 3'-terminális szakaszából állítjuk elő, amely egy természetesen vakuolárisan előforduló protein molekulát kódol és hogy az említett DNS szekvencia egy olyan rövid C-terminális peptid fragmentumot (C-terminális szakaszok) kódol, amely az asszociált génterméknek a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős.
3. Az 1. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az említett szekvenciát egy növényi kitináz gén 3'-terminális szakaszából állítjuk elő és hogy az említett szekvencia egy rövid C-terminális peptid fragmentumot (C-terminális szakasz) kódol, amely az asszociált génterméknek a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős.
4. Az 1. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az említett szekvenciát egy növényi glükánáz gén 3'-terminális szakaszából kaphatjuk meg és hogy az említett szekvencia egy rövid C-terminális peptid fragmentumot (C-terminális szakasz) kódol, amely az asszociált génterméknek a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős.

5. Az 1. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az említett DNS szekvencia egy rövid peptid fragmentumot kódol, amely az asszociált génterméknek a vakuólába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős és hogy az 1-es számú (SEQ ID NO: 1) alábbi általános képletű nukleotid szekvenciából áll:

CGN/AGR TCN/AGW TTY GGN AAY GGN CTN/TTR TTR/CTN GTN GAY
ACN ATG TAA

amelyben N jelentése A vagy G vagy C vagy T/N;

R jelentése G vagy A;

W jelentése A vagy T/U; és

Y jelentése T/U vagy C,

vagy ennek azn mutánsaiból és variánsaiból, amelyek olyan peptid fragmentumot kódolnak, amelyek még az eredeti peptid fragmentum tipikus "targeting" tulajdonságaival rendelkeznek.

6. A 3. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az említett szekvencia lényegében tiszta formában áll rendelkezésre és a *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növényből származó bázikus kitináz gén 3'-terminális szakaszából állítjuk elő és hogy lényegében a 2-es számú (SEQ ID NO: 2) alábbi képletű nukleotid szekvenciából áll:

3'- AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA - 5',
valamint ennek azon mutánsaiból és variánsaiból, amelyek olyan peptid fragmentumot kódolnak, amely még az eredeti peptid fragmentum tipikus "targeting" tulajdonságaival rendelkezik.

7. A 3. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az említett szekvencia lényegében tiszta formában áll rendelkezésre és a *Nicotiana tabacum* L.c.v. Havana 425 növényből származó bázikus glükánáz gén 3'-terminális szakaszából állítjuk elő és hogy lényegében a 12-es számú (SEQ ID NO: 12) alábbi képletű nukleotid szekvenciából áll:

GTC TCT GGT GGA GTT TGG GAC AGT TCA GTT GAA ACT AAT GCT

ACT GCT TCT CTC GTA AGT GAG ATG TGA,

vagy ennek azon mutánsaiból és variánsaiból, amelyek olyan peptid fragmentumot kódolnak, amely még az eredeti peptid fragmentum tipikus "targeting" tulajdonságaival rendelkezik.

8. Peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy egy tetszőleges, asszociált protein molekulának a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős és hogy az 1. igénypont szerinti egy DNS szekvencia kódolja.

9. A 8. igénypont szerinti peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy egy tetszőleges, asszociált protein molekulának a növényi vakuólába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős és hogy egy természetesen vakuolárisan előforduló protein molekula C-terminális szakaszából állítjuk elő.

10. A 9. igénypont szerinti peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy egy növényi kitináz C-terminális szakaszából állítjuk elő.

11. A 9. igénypont szerinti peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy egy növényi glükánáz C-terminális szakaszából állítjuk elő.

12. A 10. igénypont szerinti peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy a növényi vakuólák számára "targeting"-szignálként működik

és hogy az 1-es és 2-es számmal jelzett (SEQ ID NO:1 és 2) aminosav szekvenciából áll

Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met,

valamint ennek azon mutánsaiból és variánsaiból, amelyek még az eredeti peptid fragmentum tipikus "targeting" tulajdonságaival rendelkeznek.

13. A 10. igénypont szerinti peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy a növényi vakuólák számára "targeting"-szignálként működik és hogy a 12-es számú (SEQ ID NO: 12) aminosav szekvenciából áll

Val Ser Gly Gly Val Trp Asp Ser Ser Val Glu Thr Asn Ala Thr
Ala Ser Leu Val Ser Glu Met,

valamint ennek azon mutánsaiból és variánsaiból, amelyek még az eredeti peptid fragmentum tipikus "targeting" tulajdonságaival rendelkeznek.

14. DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az 1-7 szabadalmi igénypontok bármelyike szerinti DNS szekvenciával lényegében homológ és még e szekvenciák találmány szerinti tulajdonságait mutatja, azaz egy olyan C-terminális peptidet kódol, amely a növényi vakuólák számára "targeting"-szignálként működik.

15. A 14. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy ez az 1-7. szabadalmi igénypontok bármelyike szerinti DNS szekvenciának a természetben előforduló variánsa vagy mutánsa.

16. A 14. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy ez egy ismert mutagnizáló eljárás segítségével előállított szekvencia.

17. A 16. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az említett mutagenizáló eljárás egy oligonukleotid-közvetítette mutagenézis.

18. A 17. igénypont szerinti DNS szekvencia azzal jellemezve, hogy az említett szekvencia a 3-7. számú (SEQ ID NO: 3-7) valamelyik nukleotid szekvenciát foglalja magába:

- (a) AGG TCT TTT GGA AAA GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
- (b) AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC AAT ACT ATG TAA
- (c) AGG TCT TTT GGA AAT GGA CTT TTA GTC CGT ACT ATG TAA
- (d) A/T GAT CTT TTG GGA AAT GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA
- (e) ATC GGT GAT CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

19. A 14-18. igénypontok szerinti bármelyik szekvencia által kódolt módosított peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy ugyanazon "targeting" tulajdonságokkal rendelkezik, mint a természetesen vakuolárisan előforduló protein molekulák C-terminális szakaszában lévő módosítatlan peptid fragmentum.

20. A 19. igénypont szerinti módosított peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy egy protein molekulával asszociálva a növényi vakuólák számára "targeting"-szignálként működik és hogy a 3-7 számmal ellátott (SEQ ID NO: 3-7) aminosav szekvenciákból áll:

- (a) Arg Ser Phe Gly Lys Asp Leu Leu Val Asp Thr Met vég
- (b) Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asn Thr Met vég
- (c) Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Arg Thr Met vég
- (d) Asp Leu Leu Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met vég
- (e) Ile Gly Asp Leu Leu Val Asp Thr Met vég

21. Az 1-7. és 14-18. igénypontok bármelyike szerinti egy DNS szekvenciából vagy e DNS szekvenciák származékaiból előállított fragmentum vagy rész-szekvencia azzal jellemezve, hogy egy olyan peptid fragmentumot kódol, amely még a kiindulási szekvencia által kódolt peptid fragmentum specifikus "targeting" tulajdonságaival rendelkezik.

22. A 21. igénypont szerinti DNS rész-szekvencia azzal jellemezve, hogy lényegében a 8-as vagy a 9-es számú (SEQ ID NO: 8 és 9) nukleotid szekvenciából áll

CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA

GGA CTT TTA GTC GAT ACT ATG TAA,

valamint olyan mutánsaiból és variánsaiból, amelyek egy olyan peptid fragmentumot kódolnak, amely még a kiindulási szekvencia által kódolt peptid fragmentum tipikus "targeting" tulajdonságait mutatja.

23. A 18. igénypont szerinti egy DNS rész-szekvencia által kódolt peptid fragmentum azzal jellemezve, hogy mint "targeting"-szignál működik a növényi vakuólák számára és hogy a 8-as vagy a 9-es számú (SEQ ID NO: 8 és 9) aminosav szekvenciából áll

Leu Leu Val Asp Thr Met vég

Gly Leu Leu Val Asp Thr Met vég,

valamint olyan mutánsaiból és variánsaiból, amelyek még a kiindulási peptid fragmentum tipikus "targeting" tulajdonságait mutatják.

24. Rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy kiméra genetikai szerkezetet tartalmaz, amelyben egy kifejezhető DNS

az 1-7, 14-18. vagy 21-22. igénypontok bármelyike szerinti egy DNS szekvenciával mesterségesen össze van kapcsolva.

25. A 24. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy egy olyan kiméra genetikai szerkezetet tartalmaz, amelyben egy tetszőleges, kifejezhető DNS az 1-7., 14-18. vagy 21-22. igénypontok bármelyike szerinti egy DNS szekvenciával, valamint növényi sejtekben működő expressziós szignálokkal és adott esetben a 3'- és/vagy 5'-szakasz további kódoló és/vagy nem kódoló szekvenciákkal funkcionális kapcsolatban van olyan módon, hogy a növényi gazda transzformációja esetén az expressziós terméknek a növényi vakuólába való célzott bejutása következik be.

26. A 25. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy növényi génekből vagy növényi vírusokból származó expressziós szignálokat, vagy pedig bakteriális expressziós szignálokat tartalmaz.

27. A 26. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy a Cauliflower Mosai Virus gének (CaMV) promóterét és/vagy terminátor szignáljait tartalmazza.

28. A 26. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy az Agrobacterium tumefaciens Ti-plazmidjából származó nopalín-szintáz gén (nos) és/vagy az oktapin-szintáz gén (ocs) expressziós szignáljait tartalmazza.

29. A 25. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy az említett rekombináns DNS molekula további, a 3'- és/vagy 5'-szakasz nem kódoló szabályozó DNS szek-

venciáit tartalmazza, amelyek a növényi szövetekben egy asszociált DNS szekvencia transzkripcióját képesek szabályozni indukció vagy represszió révén.

30. A 25. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy az említett kifejezhető DNS 5'-terminális szakaszában természetesen egy olyan szekvenciát tartalmaz, vagy pedig egy olyan szekvenciával van mesterségesen összekapcsolva, amely egy, a növényi sejtben működőképes N-terminális szignál-peptidet kódol.

31. A 24. vagy 25. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy a "targeting" szekvenciával asszociált kifejezhető DNS egy olyan strukturális gén, amely a transzformált növényi sejteknek, valamint az ezekből kialakult szöveteknek és főleg magának a növénynek a kórokozók, kemikáliák, valamint a káros környezeti hatások ellen védőhatást kölcsönöz.

32. A 31. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy az említett strukturális gén egy olyan gén, amely a növényi sejtekben kitinázt fejez ki.

33. A 31. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy az említett strukturális gén a növényi sejtekben glükánázt fejez ki.

34. A 24. vagy 25. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula, azzal jellemezve, hogy a "targeting" szekvenciával asszociált kifejezhető DNS a transzformált növényi sejtben mint ilyenben, vagy mint egy magasabb szinten organizált egység alkotórészeiben - mely lehet szövet, szerv, kallusz, embrió,

vagy az egész növény - való kifejeződésekor olyan expressziós terméket eredményez, amelyet a növényi vakuóla felvesz.

35. A 24. vagy 25. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula, azzal jellemezve, hogy egy további DNS szekvenciát tartalmaz, amely egy szelektálható fenotipusos markert kódol.

36. A 24. vagy 25. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula, azzal jellemezve, hogy egy további olyan replikációs kezdőpontot tartalmaz, amely lehetővé teszi egy vagy több mikroorganizmusban a replikációját.

37. Rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy a növényi sejtekben aktiv expressziós szignálokkal funkcionális kapcsolatban olyan strukturális gént tartalmaz, amely egy természet-szerűen vakuolárisan előforduló génterméket kódol és hogy a génben természetesen meglévő 3'-terminális "targeting" szekvencia deletált vagy pedig más módon inaktivált, úgy, hogy egy növényi gazda transzformálásakor egy olyan expressziós terméket szolgáltat, amely már nem tartalmaz funkcionális C-terminális szignál-szekvenciát és így a növény extracelluláris terébe szecernálódik.

38. A 37. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy az említett strukturális gén egy bázikus kitináz gén.

39. A 37. igénypont szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy az említett strukturális gén egy bázikus glükánáz gén.

40. Klónozó vektor azzal jellemezve, hogy a 24-39. igénypon-

tok bármelyike szerinti egy rekombináns DNS molekulát tartalmaz.

41. A 24-39. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns DNS molekula azzal jellemezve, hogy transzformációs és/vagy expressziós vektort tartalmaz.

42. Shuttle vektor (ingázó vektor) azzal jellemezve, hogy egy 36. igénypont szerinti rekombináns DNS molekulát tartalmaz és hogy mind *E.coli*ban, mind *A.tumefaciens*ben stabilan képes replikálódni.

43. Gazdaszervezet azzal jellemezve, hogy a 24-39. igénypontok bármelyike szerinti egy rekombináns DNS molekulát vagy a 40-42. igénypontok bármelyike szerinti egy vektort tartalmaz.

44. A 43. igénypont szerinti gazdaszervezet azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó gazdaszervezet vagy baktérium vagy pedig növényi anyag lehet, s ez utóbbi protoplaszt, sejt, kallusz, szövet, szerv, mag, embrió, pollén, petesejt, zigóta, stb. lehet.

45. Transzgenikus növény, beleértve szexuális és aszexuális utódait, azzal jellemezve, hogy a 24-29. igénypont bármelyike szerinti egy rekombináns DNS molekulát és/vagy a 40-42. igénypont bármelyike szerinti egy vektort tartalmaz.

46. Transzgenikus növény, beleértve szexuális és aszexuális utódait, azzal jellemezve, hogy ellentétben a vadtypussal, a növényi vakuólában jelentősen megnövekedett a protein tartalom.

47. Transzgenikus növény, beleértve szexuális és aszexuális utódait, azzal jellemezve, hogy ellentétben a vadtypussal, a

növényi vakuólákban jelentősen megnövekedett a kitináz tartalom.

48. Transzgenikus növény azzal jellemezve, hogy a 44. igénypont szerinti transzformált növényi anyagból regeneráljuk.

49. A 45-48. igénypont bármelyike szerinti transzgenikus növény azzal jellemezve, hogy ez egy termékeny növény.

50. A 45-49. igénypont bármelyike szerinti transzgenikus növény szaporítóanyaga.

51. A 45-49. igénypont bármelyike szerinti transzgenikus növény egy része.

52. Eljárás expressziós termékeknek a növényi vakuólába való célzott bejuttatására, azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll:

- (a) először megfelelő forrásból izolálunk egy a vakuólába való célzott bejuttatásért felelős DNS szekvenciát vagy ezt ismert eljárások segítségével szintetizáljuk;
- (b) az említett DNS szekvenciát mesterségesen beépítjük egy tetszőleges, kifejezhető DNS szekvencia 3'-terminális végébe;
- (c) a kész szerkezetet beklónozzuk egy növényi expressziós vektorba és pedig növényekben aktiv expressziós szignálok szabályozása alá; és
- (d) az említett expressziós vektorral növény-gazdát transzformálunk, ahol az kifejeződik.

53. Az 52. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett kifejezhető DNS 5'-terminális szakaszában egy olyan

szekvenciát tartalmaz, vagy pedig egy olyan szekvenciával van mesterségesen összekapcsolva, amely egy növényi sejtben működőképes N-terminális szignál-peptidet kódol.

54. Az 52. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó kifejezhető DNS szekvencia egy strukturális gén.

55. Az 54. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett strukturális gén az asszociált "targeting"-szekvenciára vonatkoztatva heterológ.

56. Eljárás természetesen "targeting"-szekvenciát tartalmazó és ezért normál módon a növényi vakuolákba kerülő proteineknek a növényi extracelluláris térbe történő kiszilipelésére azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll:

- (a) izolálunk egy ilyen proteint kódoló DNS szekvenciát;
- (b) a nyílt leolvasási keretből eltávolítjuk a mindenkori celluláris kompartmentumba való bejuttatásért felelős "targeting"-szekvenciát a C-terminális végről;
- (c) az említett mutált DNS szekvenciát megfelelő növényi expressziós vektorba visszük át; és
- (d) a kész szerkezettel növényi gazdát transzformálunk.

57. Eljárás tetszőleges asszociált génterméknek a növényi vakuolába való célzott bejuttatásáért ("targeting") felelős peptid fragmentumot kódoló rövid DNS szekvencia előállítására, azzal jellemezve, hogy egy természetesen vakuolárisan előforduló protein molekulát kódoló DNS szekvencia C-terminális szakaszát ismert eljárások segítségével a hozzátartozó strukturális gén 3'-terminális szakaszából izoláljuk, ezt adott esetben módo-

sitjuk, azonban úgy, hogy "targeting" tulajdonságai eközben nem változzanak.

58. Eljárás az 1-7., 14-18. vagy 21-22. igénypontok bármelyike szerinti egy DNS szekvencia előállítására, azzal jellemezve, hogy kémiai módszerekkel szintetizáljuk.

59. Az 57. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett kódoló DNS szekvenciát egy megfelelő cDNS vagy genomiális DNS klón 3'-terminális végéből izoláljuk.

60. Eljárás rekombináns DNS molekula előállítására, azzal jellemezve, hogy egy tetszőleges, kifejezhető DNS-t az 1-7., 14-18. vagy 21-22. igénypont szerinti DNS szekvenciával, valamint növényi sejtekben aktiv expressziós szignálokkal és adott esetben a 3'- és/vagy 5'-szakasz további kódoló és/vagy nem kódoló szekvenciáival mesterségesen összekapcsoljuk úgy, hogy egy növényi gazda transzformációjakor az expressziós terméknek a növényi vakuólába való célzott bejutása következzen be.

61. A 60. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az említett kifejezhető DNS 5'-terminális szakaszában egy olyan szekvenciát tartalmaz, vagy pedig egy olyan szekvenciával van mesterségesen összekapcsolva, amely a növényi sejtekben működőképes egy N-terminális szignál-peptidet kódol.

62. A növényi vakuólába célzottan bejuttatandó génterméket tartalmazó transzformált növényi anyag előállítása azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll:

- (a) először megfelelő forrásból egy a vakuólába való célzott bejuttatásért felelős DNS szekvenciát izolálunk vagy ezt

- ismert eljárások segítségével szintetizáljuk;
- (b) az említett DNS szekvenciát mesterségesen beépítjük egy tetszőleges, kifejezhető DNS szekvencia 3'-terminális végébe;
 - (c) a kész szerkezetet beklónozzuk egy növényi expressziós vektorba, és pedig növényekben aktiv expressziós szignálok szabályozása alá;
 - (d) az említett expressziós vektorral - ismert eljárások alkalmazásával - növényi gazdát transzformálunk és azt ott kifejezzük; és
 - (e) az így kezelt növényi anyagot szűrjük és a pozitíven transzformált növényi anyagot izoláljuk.
63. Az extracelluláris térbe célzottan szecernálendő génterméket tartalmazó transzformált növényi anyag előállítása azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll:
- (a) izolálunk egy ilyen proteint kódoló DNS szekvenciát;
 - (b) a nyílt leolvasási keretből eltávolítjuk a mindenkori celluláris kompartmentumba való bejuttatásért felelős "targeting"-szekvenciát a C-terminális végről;
 - (c) az említett mutált DNS szekvenciát megfelelő növényi expressziós vektorba visszük át;
 - (d) a kész szerkezettel növényi gazdát transzformálunk; és
 - (e) az így kezelt növényi anyagot szűrjük és a pozitíven transzformált növényi anyagot izoláljuk.
64. Eljárás új "targeting"-szekvenciák felkutatására azzal jellemezve, hogy megfelelő növényi anyagból először cDNS vagy

genomiális géntárat hozunk létre, majd ezt az 1-7., 14-18. vagy 21-22. igénypontok bármelyike szerint egy DNS szekvencia, mint szonda-molekula alkalmazásával, olyan heterológ DNS szekvenciák jelenlétére vizsgáljuk, amelyek az említett szonda-molekulával hibridizálni képesek.

A meghatalmazott

167 oldal + 1 táblával
Ker!

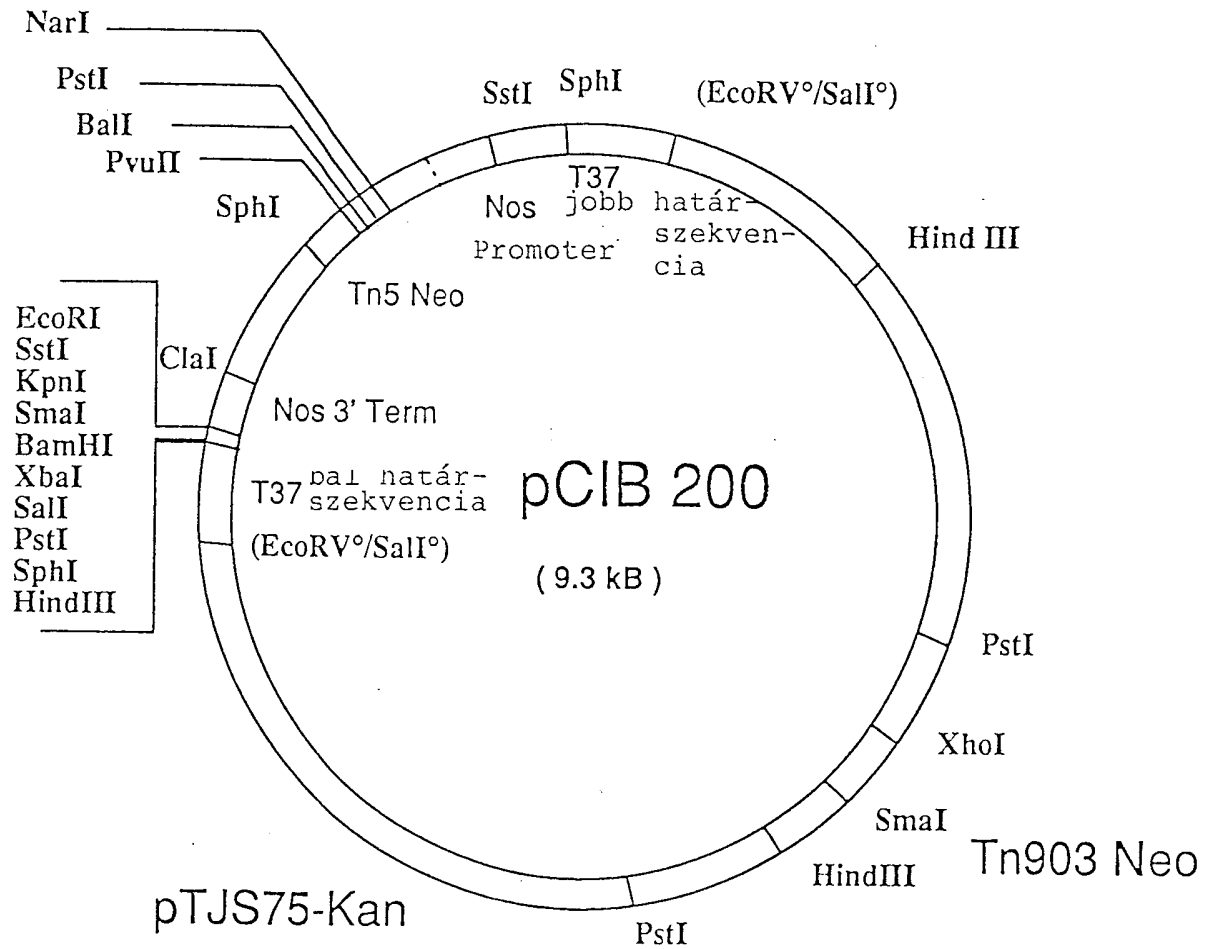
  

24.990

10994/91

54.369/PA

1/1



1. Á B R A