

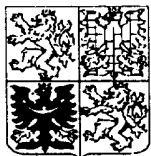
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

283 124

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **3923-92**

(22) Přihlášeno: **28. 12. 92**

(30) Právo přednosti:
09. 01. 92 US 92/791929

(40) Zveřejněno: **16. 03. 94**
(Věstník č. 3/94)

(47) Uděleno: **12. 11. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **14. 01. 98**
(Věstník č. 1/98)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/82

C 12 N 15/28

C 12 N 5/10

A 01 H 5/00

(73) Majitel patentu:

NOVARTIS AG, Basle, CH;

(72) Původce vynálezu:

Brunke Karen J., Belmont, CA, US;

Wilson Stacy L., Cupertino, CA, US;

(74) Zástupce:

Traplová Jarmila JUDr. advokátka, U
průhonu 36, Praha 7, 17000;

(54) Název vynálezu:

**DNA - konstrukt, který obsahuje
promotor a způsob regulace exprese**

(57) Anotace:

Promotor hsp80 (Brassica), který byl izolován, a který umožňuje konstitutivní expresi heterologních genů v rozsáhlé řadě tkání a orgánů. Popisuje též různé deletované mutanty a hybridní promotory, které si uchovávají aktivitu nebo/a vykazují zvýšenou aktivitu, a upstream aktivační sekvence, které mohou jednotlivě nebo v kombinaci umožňovat konstitutivní expresi genu. Tyto sekvence mohou též propůjčovat konstitutivní expresivitu heterologním, nekonstitutivním promotorům.

CZ 283 124 B6

DNA-konstrukt, který obsahuje promotor a způsob regulace expreseOblast techniky

5

Vynález se týká nového promotoru, který je funkční v rostlinách, přesněji promotoru, který řídí expresi žádaného genu konstitutivním způsobem. Zahrnuje též různé upstream sekvence, které mohou být použity k vytvoření hybridních promotorů majících požadované účinky.

10

Dosavadní stav techniky

Geny tepelného šoku (hsp geny) jsou známy v mnoha organismech, včetně kvasinek, *Drosophily* a některých druhů rostlin. Jedna skupina genů tepelného šoku exprimuje protein pouze jako odpověď na tepelný stres. Jiná skupina genů tepelného šoku má nízkou základní hladinu působení, která se velmi zvyšuje při tepelné indukci.

V genetickém inženýrství při zavádění heterologního genu do rostlin je výběr promotoru často rozhodujícím faktorem. Zatímco u některých genů může být žádoucí jejich exprese pouze jako odpověď na konkrétní stimul, nebo lokalizace jejich exprese v určitých tkáních, jiné geny je vhodnější exprimovat konstitutivně, to znamená v celé rostlině po celou dobu a ve většině tkání. V minulosti byl pro konstitutivní expresi heterologních genů používán promotor 35S z viru mosaiky květáku (Cauliflower Mosaic Virus = CaMV). Z regulačních a jiných důvodů je žádoucí regulovat expresi heterologních genů promotorem, který není patogenního původu. Navíc může použití rostlinného promotoru měnit hladinu působení v konkrétních tkáních a spektrum tkání, ve kterých dojde k expresi, ve srovnání s virovými promotory.

Podstata vynálezu

30

Vynález se týká konstitutivního promotoru z květáku (*Brassica oleracea* cv. 'Delira'), to znamená takového, který exprimuje geny stále a ve většině tkání a orgánů. Promotor může být operativně navázán k libovolnému genu a řídit expresi tohoto genu. Tento promotor se odlišuje od promotorů výše popsaných hsp genů tím, že má vysokou základní hladinu konstitutivní exprese a mírně zvýšenou expresi po tepelné indukci.

35

Tento promotor byl označen "promotor hsp80", protože je konstitutivním promotorem s konsensním elementem tepelného šoku a byl získán z genu, který vykazuje určitou homologii se skupinou hsp genů z jiných druhů. Promotor hsp80 řídí produkci proteinů tepelného šoku s vysokou základní hladinou při normální teplotě (20 až 25 °C) a vykazuje lehce zvýšenou expresi při tepelném stresu (35 až 40 °C).

40

Popis obrázků:

45

Obrázek 1 znázorňuje plazmid pZO217 a vytvoření plazmidů pZO601 a pZO601BS. Obrázek 2 znázorňuje pZO602.

50

Sekvence kompletního promotoru je uvedena v Tabulce 1. (SEQ. ID. č. 1). Kompletní nativní sekvence má 1568 párů bází. Nukleotidy jsou číslovány v negativním pořadí od místa počátku translace (ATG) pro nativní protein tepelného šoku. V této sekvenci byly identifikovány následující oblasti:

A) "TATA" box je tvořen osmi páry bází sekvence "TATATATA" umístěné od -97 do -90, včetně.

- B) Od -61 do -1 je umístěna vedoucí sekvence mRNA o délce 61 bp.
- C) Čepička byla identifikována v poloze -61.
- 5 D) Oblast od -604 do -488 zřejmě obsahuje upstream aktivační sekvenci pro tento promotor. Tato oblast je označena UAS 1. Již v předběžných testech bylo pozorováno, že tato oblast propůjčuje konstitutivní aktivitu a byla dříve označována "konstitutivní box".
- 10 E) Oblast od -1000 do -604 zřejmě obsahuje další upstream aktivační sekvenci. Tato oblast je označena UAS 2.
- F) Oblast od polohy -488 do -120 zřejmě obsahuje další upstream aktivační sekvenci. Tato oblast je označena UAS 3.
- 15 G) Přítomny jsou dvě přímé repetice, a to mezi -779 až -741 a mezi -740 až -702. Sekvence obsahující část přímé repetice se též nachází v poloze od -701 do -677.
- H) Jeden konsensní element tepelného šoku je umístěn v poloze od -131 do -120 a další element je umístěn v poloze od -244 do -237.

20 Jedno provedení vynálezu tedy popisuje DNA-konstrukt obsahující promotor hsp80 (Brassica) operabilně navázaný k heterolognímu genu. Vzhledem k tomu, že v této sekvenci DNA mohou být provedeny malé změny bez podstatného ovlivnění aktivity promotoru, vynález zahrnuje též sekvence DNA, které jsou "funkčními ekvivalenty" promotoru hsp80 (Brassica) a konstrukty

25 obsahující takové sekvence DNA operabilně navázané k heterolognímu genu.

V popisu i patentových nárocích platí následující definice termínů:

30 "Funkční ekvivalent" je libovolná sekvence DNA, která je komplementární k sekvenci DNA, která za přísných hybridizačních podmínek bude hybridizovat s referenční sekvencí a má promotorovou aktivitu podobnou jako promotor hsp80 (Brassica).

35 "Přísné hybridizační podmínky" jsou takové podmínky, kdy se hybridizace provádí při 60 °C v 2,5X solném citrátovém pufru (saline citrate buffer = SSC pufr) s následným několikanásobným propláchnutím při 37 °C při snížené koncentraci pufru, která neovlivní vzniklé hybridizace.

40 "Heterologní gen" je sekvence DNA kódující libovolný peptid nebo protein jiný než protein hsp80 (Brassica).

"Deletovaný promotor" je libovolný promotor hsp80 (Brassica), který má delecí a stále si zachovává aktivitu.

45 "Funkční ekvivalent deletovaného promotoru" je deletovaný promotor, který měl další delecí a zachovává si alespoň podstatně ekvivalentní aktivitu ve srovnání s deletovaným promotorem.

"Regulovatelný promotor" je libovolný promotor jehož aktivita je ovlivňována cis nebo trans regulačním faktorem či faktory.

50 "Konstitutivní promotor" je libovolný promotor, který je aktivní ve většině tkání a orgánů po většinu času.

Promotor hsp80 (nebo jeho funkční ekvivalent) může být použit ke konstitutivní expresi libovolného požadovaného heterologního genu. Příklady vhodných heterologních genů zahrnují

(bez omezení): insekticidní toxiny (jako jsou například z *Bacillus thuringiensis*), geny rezistence na herbicidy, antimikrobiální geny, antifungální geny, antivirové geny a geny proti poškození.

5 Je účelné, aby byl konstrukt hsp80-heterologní gen vložen do vektoru, a tento vektor použit k transformování eukaryotického hostitele. Eukaryotickým hostitelem je s výhodou rostlinná buňka nebo rostlinný protoplast. Vhodné vektory se pochopitelně mění v závislosti na vybraném hostiteli. U dvouděložných může být vektor zaveden do protoplastu elektroporací nebo vektorem může být derivát Ti-plazmidu *Agrobacterium tumefaciens* (A. t.), který infikuje buňku nebo protoplast a může být použita transformace zprostředkovaná A. t., včetně tzv. binárních technik. 10 (Viz například Gasser C. S. a kol., 1989, Science 244: 1293 až 1299). Jednoděložné jsou výhodně transformovány za použití tzv. "balistické" techniky (Gasser a kol., viz výše) nebo mohou být též transformovány za použití protoplastů.

15 V každém případě jsou vhodné transformační vektory a transformační postupy dobře o sobě známy. Transformované buňky nebo protoplasty jsou kultivovány ve vhodném kultivačním médiu, a je regenerována transformovaná rostlina. Transformovaná rostlina exprimuje konstitutivně heterologní gen.

20 Překvapivě bylo též zjištěno, že v tomto promotoru mohou být provedeny různé delece a výsledný deletovaný promotor vykazuje buď: a) zvýšenou aktivitu; b) v podstatě stejnou aktivitu jako nativní promotor; nebo c) zachovanou aktivitu.

25 Dalším provedením vynálezu je tedy sekvence DNA obsahující deletovaný promotor z promotoru hsp80 (*Brassica*). Dalším provedením vynálezu je DNA-konstrukt obsahující deletovaný promotor operabilně navázaný k heterolognímu genu. Toto provedení vynálezu zahrnuje též funkční ekvivalenty deletovaných promotorů a konstrukty obsahující funkční ekvivalent deletovaného promotoru a heterologní gen.

30 Byly vytvořeny různé deletované a hybridní promotory, jako je popsáno v Příkladech provedení vynálezu. První skupina deletovaných promotorů je označena "série 601BS." Tyto promotory jsou charakterizovány tím, že obsahují deleci, která zahrnuje páry bází od -118 do -246. Bylo zjištěno, že jeden promotor z této série, 601BSΔ 2-3, který obsahuje deleci od -493 do -118 si zachovává přibližně 50 % až 75 % aktivity ve srovnání s intaktním promotorem.

35 Druhá skupina deletovaných promotorů je označena "série 602." Všechny tyto promotory obsahují deleci minimálně od -488 do -134, a mohou obsahovat deleci různé délky na 5' -konci, jak je shrnuto v Příkladu 3. Překvapivě některé delece zvyšují aktivitu.

40 Deletovaný promotor 603 obsahuje deleci od -1125 do -134. Tento promotor si zachovává pouze okolo 10 % aktivity intaktního promotoru. Deletovaný promotor 604 obsahuje delece od -1568 do -1125 a od -496 do -134, a zachovává si přibližně 25 % aktivity. Deletovaný promotor 605 obsahuje delece všech párů bází upstream od -488, a vykazuje odpovídající snížení aktivity pouze na přibližně 6 až 8 %.

45 Jedna zejména důležitá oblast pro aktivitu leží mezi -134 a -120. Deletovaný promotor 601BS (BSph) má deletovanou pouze tuto malou oblast, ale jeho aktivita klesá pouze na přibližně 50 až 75 % intaktního promotoru. Výhodné promotory podle vynálezu proto obsahují alespoň tuto krátkou sekvenci.

50 Jak již bylo uvedeno výše, oblast o rozsahu 116 bp umístěná od -604 do -488 (UAS 1) nebo její část je zřejmě odpovědná za propůjčování konstitutivní aktivity v řadě tkání. UAS 2 a UAS 3, jak byly popsány výše, zřejmě propůjčují aktivitu v dalších tkáních. Dalším provedením vynálezu je tedy propůjčování konstitutivní aktivity jinak nekonstitutivnímu promotoru (jako je

promotor, který je normálně indukovatelný nebo jinak regulovatelný) operabilním navázáním k nebo vložení do indukovatelného nebo regulovatelného promotoru jedné nebo několika upstream aktivačních oblastí, které samy vyvolávají aktivitu v některých až většině orgánů/tkání a kombinované dávají tzv. konstitutivní aktivitu. Vynález zahrnuje DNA-konstrukty obsahující takovéto promotory s propůjčenou konstitutivní aktivitou operativně navázané k strukturnímu genu, postupy například pro transformování rostlinných buněk a protoplastů za použití těchto konstruktů a rostlinné buňky a protoplasty transformované s jejich pomocí.

Je známo, že je možné, aby oblasti menší než jsou oblasti UAS 1, 2 a 3 byly dostatečné pro propůjčování konstitutivní aktivity, což lze testovat prováděním delecí v těchto oblastech za použití metod o sobě dobře známých. Promotory s delecemi v oblastech UAS mohou být poté testovány na zachování si konstitutivní aktivity. Takové testy jsou též o sobě známy.

Oblasti UAS 1, 2 a 3 samotné nebo společně mohou být též použity k navrácení aktivity promotoru, který byl inaktivován delecemi nebo/a mutací, což tvoří další provedení vynálezu. Příkladem takového použití může být promotor CaMV 35S, který byl deletován až do stavu, kdy již nebyl funkční. Inzerce elementů UAS 1, 2 a 3 v kombinaci nebo samotných obnovuje promotorovou aktivitu v některých nebo všech tkáních.

Vynález je ilustrován následujícími Příklady provedení vynálezu, které však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace promotoru hsp80

Genomová knihovna *Brassica oleracea* (cv. 'Delira') se vytvoří ve fágu Lambda Charon 35 a buňkách K802 za použití metod, které v podstatě popsal Maniatis a kol. (1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, str. 282-283). Screening této knihovny se provede s fragmenty PvuI-StuI z genu hsp83 (*Drosophila*) /Hackett, R. W. a kol., 1983, Nucl. Acids Res. 11 (20): 7011 - 7030/. Získá se dvacet rekombinantů se zřejmou homologií s genem *Drosophila* a provede se Southern blotting za použití fragmentu genu hsp83 (*Drosophila*) jako sondy. Fragment HindIII o délce 5,8 kb se vybere pro subklonování ve vektoru pUC9, a je označován jako pZO217. Tento plazmid je znázorněn na obrázku 1.

Dále se do místa PstI známého vektoru pUC19 vloží gen pro chloramfenikolacetyltransferasu (CAT) /Pharmacia/. Poté se do místa PstI-HindIII vloží terminátor NOS (Bevan, M. a kol., 1983. "Structure and Transcription of the Nopaline Synthase Gene Region of T-DNA" Nucl. Acids Res. 11 (2)). Tento výsledný plazmid je označen pZO30. Fragment BglII z pZO217 se oddělí a subklonuje do místa BamHI pZO30. Výsledkem je konstrukt promotor-gen pro CAT-terminátor NOS, který se transferuje jako fragment EcoRI-HindIII do komerčně dostupného vektoru pTZ18R (od firmy Pharmacia), čímž se vytvoří pZO601, jak je znázorněno na obrázku 1.

Příklad 2

Sestavení plazmidů

In vitro mutagenese promotoru hsp80 v pZO601 se provede za použití oligonukleotidicky řízeného in vitro mutagenezního systému (Amersham). Podle instrukcí výrobce se syntetizují dva

oligonukleotidy, aby se v promotoru upstream od TATA boxu vytvořila dvě jedinečná restrikční místa, BamHI v poloze -134 a SphI v poloze -120. (Všechny polohy nukleotidů jsou uváděny relativně k místu iniciace translace.) Tento nový plazmid je označen pZO601BS, a je též znázorněn na obrázku 1.

5

Plazmid pZO602 a pZO603

Krok A) pZO601BS se rozštěpí BamHI a konce se doplní za použití Klenowa fragmentu DNA-polymerasy. DNA se poté rozštěpí KpnI a výsledný fragment neobsahující promotor se oddělí na nízkotajícím agarosovém gelu.

10

Krok B) pZO601BS se rozštěpí BamHI a KpnI a promotor hsp80 se oddělí na nízkotajícím agarosovém gelu. Tento fragment se vyčistí za použití ELUTIPu (Schleicher a Schnell) a rozštěpí se buď DraI, nebo FnuDII.

15

Krok C) DraI-fragment (-1568 až -488) získaný v kroku B) se liguje do fragmentu neobsahujícího promotor, který byl získán v kroku A). Výsledný plazmid je označen pZO602, a je znázorněn na obrázku 2.

20

Krok D) FnuDII-fragment (-1568 až -1125) se liguje do fragmentu neobsahujícího promotor, který byl získán v kroku A). Výsledný plazmid je označen pZO603.

Plazmid pZO604

Krok A) pZO601BS se rozštěpí BamHI a SmaI, a místo BamHI se doplní T4 DNA-polymerasou a deoxynukleotidy. Výsledný fragment neobsahující promotor se oddělí na nízkotajícím agarosovém gelu.

25

Krok B) pZO601BS se rozštěpí FnuDII. FnuDII-fragment (-1125 až -496) se liguje do fragmentu neobsahujícího promotor, který byl získán v kroku A), čímž vznikne pZO604.

30

Plazmid pZO605

Krok A) pZO601BS se rozštěpí BamHI a SmaI a výsledný fragment neobsahující promotor se oddělí na nízkotajícím agarosovém gelu.

35

Krok B) pZO601BS se rozštěpí DraI. DraI-fragment (-488 až -134) se liguje do fragmentu neobsahujícího promotor, který byl získán v kroku A), čímž vznikne pZO605.

40

Deletované mutanty

Z plazmidu pZO602 se vytvoří série 5'-delecí v promotoru hsp80. pZO602 se rozštěpí SacI a SmaI, čímž se vytvoří substrát pro štěpení exonukleasou III (Stratagene). Po ošetření exonukleasou III po různě dlouhou dobu se výsledné molekuly DNA otupí pomocí nukleasy z fazolí (Mung Bean Nuclease; Boehringer Mannheim). Molekuly DNA se oddělí za použití elektroforesy na nízkotajícím agarosovém gelu. Výrazné pásy se vyříznou, naředí a ligují. Po transformaci se vyberou deletované mutanty a sekvenují se přes spojovací bod (junction point).

45

Série 3'-delecí v promotoru hsp80 se vytvoří z pZO601BS rozštěpením BamHI a SphI a poté provedením stejného postupu jaký byl popsán pro vytvoření 5'-delecí.

50

Příklad 3

Biologické testy

5 Uchovávání buněčné linie mrkve

Suspenzní kultura mrkve (Redwood City Wild Carrot = RCWC) získaná ze Stanford University se uchovává v následujícím suspenzním médiu pro mrkev: 1 X Murashige-Skoog solí, 1 mg/l nikotinové kyseliny, 1 mg/l pyridoxin-hydrochloridu, 1 mg/l thiaminu, 100 mg/l inositolu, 0,1 mg/l 2,4-D, 30 g/l sacharosy, a upraví se pomocí KOH na konečné pH 5,8. Kultura se uchovává naředěním v poměru 1 : 10 do čerstvého média každých 7 dnů.

Vytvoření protoplastů

15 Suspenzní kultura RCWC se naředí v poměru 1 : 10 čtyři dny před použitím. 50 ml kultury (což odpovídá přibližně 5 ml objemu buněk v obalech) se centrifuguje po dobu 10 minut při 500 g. Buňky se poté znovu převedou do suspenze v 50 ml následujícího zfiltrovaného enzymového roztoku pro mrkev: 10 g/l cellulysinu (Calbiochem), 5 g/l rhyzomu (Genecor), 0,4 M mannitolu, 50 mM chloridu vápenatého, 10 mM octanu sodného, pH = 5,8. Buňky se mírně třepou po dobu 20 2 hodin, aby došlo ke štěpení. Protoplasty se dvakrát promyjí a znovu se převedou do suspenze v kultivačním médiu pro mrkev (Carrot Culture Medium = CCM), které je stejného složení jako výše popsané suspenzní médium pro mrkev s přídavkem 0,4 M mannitolu. Protoplasty se spočítají na hemacytometru při naředění 1 : 10, aby byla zjištěna koncentrace.

25 Elektroporace

Pro provádění všech elektroporací se používá PG200 Progenitor II (Hoefer) vybavený kruhovou elektrodou. Elektroporace vzorků se provádí v sterilních mikrotitračních nádobách s 24 otvory při 250 voltech po dobu 100 ms.

30 Každý plazmid obsahující CAT (Pharmacia)-konstrukt se testuje řadou pokusů, z nichž každý se 3x až 4x opakuje. V každém pokusu se jako kontroly používá 30 až 50 µg plazmidu pZO601BS. Všechny ostatní plazmidy jsou testovány za použití ekvivalentního molárního množství DNA ve srovnání s pZO601BS.

35 Přibližně 10^6 protoplastů se vloží do 1,5 ml zkumavek, centrifuguje se po dobu 2 minut při 500 g, a převážná část supernatantu se odstraní. Každá DNA se přidá k 75 µl 2M KCl. Objem se upraví na 1 ml přidáním CCM (pH se upraví na 8,0) a tato směs se elektroporuje a okamžitě se rozředí v 5 ml CCM o pH 5,8 v Petriho misce. Naředěné vzorky se skladují ve tmě po dobu 1 až 2 dnů před prováděním testů "CAT assay".

40

Promotor	Deletované oblasti	Relativní aktivita
601BS	Žádné	100 %
602 Δ3-2	-1568 až -1000 a -488 až -134	125 až 175 %
602 Δ3-3	-1568 až -948 a -488 až -134	75 až 125 %
602 Δ4-9	-1548 až -830 a -488 až -134	100 až 150 %
602 Δ4-6	-1548 až -628 a -488 až -134	75 až 100 %
601BS Δ2-3	-493 až -118	50 až 75 %
603	-1125 až -134	Přibližně 10 %
604	-1568 až -1 125 a -496 až -134	Přibližně 25 %
605	-1568 až -488	6 až 8 %
601BS(BSph)	-134 až -120	50 až 75 %

Příklad 4

Konstitutivní exprese v kompletní rostlině

5

Tabák se transformuje za použití následujícího postupu:

Rostlinná tkáň

- 10 Explantáty tabákových listů se získají ze sterilně pěstovaných rostlin tabáku. Sterilní rostliny tabáku se vegetativně rozmnožují oddělováním vrcholových nodů existující rostliny v přibližně jednoměsíčních intervalech a jejich rekultivací v pórovitých nádobách obsahujících 75 ml ztuhlého agarového média prostého hormonů (médium 0/0), které obsahuje soli Murashige-Skoog, 1 ml/l z roztoku 100 mg/l myo-inositolu, 5 ml/l vitamixu (což odpovídá 0,5 mg/l
- 15 pyridoxin-hydrochloridu, 0,5 mg/l kyseliny nikotinové, a 1,0 mg/l thiaminu) a 3 % sacharosy. Rostliny tabáku se pěstují v nepřetržitém světle střední intenzity. Misky se uzavřou pásem zeleného papíru, nebo se mohou nechat neuzavřené, aby byla umožněna výměna vzduchu.

Agrobakteriální vektor

20

K transformaci *Agrobacterium tumefaciens* se použije systém binárních vektorů, a bakterie se poté použijí k transformaci buněk tabáku.

Obecné postupy

25

Agrobakteriální vektory se skladují při -70 °C. Přibližně 18 hodin před transformací se 25 ml sterilisovaného tekutého média LB3 (viz níže) obsahujícího vhodná antibiotika, inokuluje 100 až 500 mikrolitry kultury *Agrobacteria*. Kultura se nechá růst přes noc na třepačce s 250 otáčkami za minutu při 28 °C.

30

Médium LB3 (na 1 litr):

- | | |
|--------------------------------------|------|
| trypton | 10 g |
| kvasničný extrakt | 5 g |
| NaCl | 4 g |
| KCl | 1 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 3 g |
- doplní se vodou do 1 litru a rozdělí po 25 ml/baňku.

- 40 Antibiotiky jsou 25 µg/l streptomycinu a 50 µg/l kanamycinu. Transformace se obecně provádí v době, kdy jsou buňky ve své logaritmické fázi; O. D. při 600 nm je s výhodou 0,50 až 1,0. Kultura by měla být naředěna na koncentraci 10⁸ buněk/ml v 50 ml tekutého média 0/0 prostého hormonů.

- 45 Explantáty tabákových listů se ponoří na 3 minuty do roztoku transformovaného *Agrobacteria*, jak bylo připraveno výše, o koncentraci 10⁸ buněk/ml. Explantáty se vyjmou a osuší na sterilním filtračním papíru Whatman. Poté se na dva dny umístí do regeneračního média, ve kterém nejsou žádná antibiotika. Třetí den se ošetřené explantáty přenesou do média obsahujícího vhodná antibiotika. Explantáty zůstanou na těchto deskách po dobu tří až čtyř týdnů, do té doby, než jsou
- 50 pravděpodobně transformované výhonky dostatečně velké k tomu, aby byly přeneseny do zakořeňovacího média. Zakořeňovací médium je médium 0/0 o poloviční koncentraci, které obsahuje 250 mg/l carbenicillinu a, v závislosti na konstruktu, buď 100 mg/l kanamycinu nebo 50 mg/l hygromycinu. Přibližně za dva týdny výhonky zakoření a zezelenají. Poté se přenesou do

nádob a každé rostlině se přidělí její vlastní identifikační číslo. Poté se k demonstrování konstitutivní promotorové aktivity provedou testy na různých tkáních.

Transformační vektory

5

pZO639

Sestaví se plazmid podobně jako pZO601 s tím, že místo hsp80-gen pro CAT-terminátor NOS obsahuje hsp80-GUS-terminátor NOS. Tento plazmid je označen pZO612.

10

Plazmid pBin19 (Clonotech) se rozštěpí pomocí EcoRI a HindIII. Plazmid pZO612 se rozštěpí ScaI, EcoRI a HindIII. Oba štěpy se rozdělí na nízkotající agarose. Fragment vektoru pBin19 o délce 12 kb a fragment hsp80-GUS-NOS o délce přibližně 3,6 kb se izolují a následně ligují k sobě. Výsledný plazmid, označený pZO639 lze identifikovat se štěpem PstI.

15

pZO640

pZO640 se sestrojí podle výše popsaného postupu. Od pZO639 se liší tím, že má zkrácený fragment hsp80 (o délce 0,624 kb ve srovnání s délkou celého promotoru 1,56 kb).

20

pZO641

pZO641 se sestrojí podle výše popsaného postupu. pZO641 obsahuje místo celého promotoru pouze část promotoru hsp80 o délce 0,252 kb.

25

pZO642

pZO642 se sestrojí podle výše popsaného postupu. Místo promotoru hsp80 nebo jeho derivátu obsahuje pZO642 fragment promotoru CaMV 35S-GUS-NOS.

30

Příklad 5

Promotorová aktivita

35

U rostlin získaných postupem z příkladu 4 se testuje exprese heterologního genu, GUS. Odeberou se vzorky tkání a testují se na přítomnost GUS. Aktivita GUS se detekuje ve vzorcích všech tkání. Kontrolní tkáň (získané z netransformovaných rostlin podrobených stejnému kultivačnímu a regeneračnímu postupu) se též testují na aktivitu GUS, která je naměřena nulová. Číslo v závorkách udává celkový počet rostlin, z kterých byly odebírány vzorky. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet pozitivně testovaných (bylo pozorováno modré zbarvení). "NT" znamená netestováno, "NA" znamená není k dispozici, "M" znamená mutant.

40

Plazmid	Konstrukt (plus GUS; terminátor NOS)
pZO639	plná délka hsp80
pZO640	-1000 až -488 + -134 až -23 z hsp80 (obsahuje UAS 1 + UAS 2 + TATA oblast)
pZO641	-628 až -488 + -134 až -23 z hsp80 (obsahuje UAS 1 + TATA oblast)
pZO642	promotor 35S

45

Tkáň (7)	pZO639 (7)	pZO640 (6)	pZO641 (5)	pZO642 (7)
listový mezofyl	1/7	1/5, 1NT	1/5	5/7
listové cévy	5/7	1/6	2/5	3/7
listové trichomy	4/7	1/6	2/5	1/7
laterální meristém	2/7	0/5, 1NT	1/5	4/7
laterální trichomy	1/7	0/6	0/5	1/7
cévy kališních lístků	3/7	3/6	2/4, 1NA	4/6, 1NA
trichomy kališních lístků	4/7	1/6	0/4	0/6, 1NA
pestík	2/7	4/6	0/4, 1NA	4/6, 1NA
cévy květní trubky/ /květních plátků	1/7	1/6	1/4, 1NA	3/6, 1NT
trichomy květní trubky/květních plátků	4/7	2/6	0/4	3/6, 1NT
nezralý prašník	4/7	5/6	2/3, 1NA, 1M	3/5, 1NA, 1NT
pyl	5/5, 2NA	5/6	3/3, 1NA, 1M	0/6, 1NA
kořeny	6/7, 1NT	1/4, 2NT	0/4, 1NT	3/6, 1NT
stonek	2/2, 6NT	0/2, 4NT	0/1, 4NT	1/1, 6NT

5 Tyto údaje ukazují, že promotor hsp80 je v určitém rozsahu aktivní ve všech testovaných tkáních, ačkoli intenzita vybarvování byla ve většině případů nižší než u promotoru 35S. Obecně se mezofyly listů nebarví až do vakuové infiltrace, ale potom se barví velký počet buněk, ačkoli jejich vzhled připomíná spíše trichomy než typické mezofylní buňky.

Příklad 6

10 Hybridní promotory

15 K neaktivnímu heterolognímu minimálnímu promotoru se ligují různé upstream oblasti promotoru hsp80, aby se zjistilo, zda upstream oblast bude propůjčovat aktivitu. Fragmenty uvedené níže se klonují upstream od zkráceného promotoru CaMV 35S, který je v poloze od -46 (relativně k místu počátku transkripce CaMV), do +131 (TATAAA box je v poloze -31 až -25), který je zde dále označován jako "promotor -46 35S". (číslování uváděné zde pro popsání zkráceného CaMV35S se týká samotného CaMV35S a není shodné s číslováním používaným jinde pro hsp80 a jeho fragmenty) Plazmid pZO625 se skládá z promotoru -46 35S, intronu 6 z genu ADHIS kukuřice, oblasti kódující β -glukuronidasu (GUS) a terminátoru NOS v pT7T3 18U (k dispozici od firmy Pharmacia). Následující fragmenty hsp80 (Brassica) se ligují upstream od -46 35S:

fragment promotoru:

25 Fragment (číslovaný podle tabulky 1) Plazmid

-628 až -488 plus -134 až -120 pZO670
-1000 až -488 plus -134 až -120 pZO681
-1000 až -604 pZO682
30 -488 až -120 pZO683
-1548 až -488 plus -134 až -120 pZO689

Hybridní promotory obsažené ve výše uvedených plazmidech jsou označovány jako hybridní promotory 670, 681, 682, 683, respektive 689.

35

Testuje se též pZO612 (který je stejný jako pZO601 s tím, že gen pro CAT se nahradí genem pro GUS) a sestává z plné délky promotoru hsp80 řídicího GUS s terminátorem NOS (ale ne intronu) v pTZ 18R.

- 5 Z mrkve, jak je popsáno výše, kukuřice (Black Mexican Sweet maize - BMS), a tabáku se připraví protoplasty. Protoplasty se elektroporují s požadovaným plazmidem, nechají se regenerovat po dobu jednoho dne, poté se extrahují a extrakty se testují na aktivitu GUS, která se měří spektrofotometricky. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty, vztažené ke konstruktu obsahujícímu plnou délku promotoru 35S, pZO663 (35S od -366 do +131, intron 6, GUS, terminátor NOS). Promotor 35S o plné délce popsal Franck a kol., Cell., Sv. 21, 285 - 294 (1980).

Transientní "GUS assay"

Plazmid	Tabák	Mrkev	BMS
pZO663	1,0	1,0	1,0
pZO625	0,03	0,01	0,03
pZO670	0,16	0,28	0,02
pZO681	0,13		
pZO682	0,24	0,23	0,08
pZO683	0,17		
pZO689	0,16	0,32	0,03
pZO612	0,65		

15

Transientní "CAT assay"

Plazmid	Mrkev
pZO602 Δ4-6	0,75 až 1,0
pZO602 Δ3-2	1,25 až 1,75
pZO605	0,06 až 0,08
pZO601 BS Δ2-3	0,05 až 0,75
pZO601 BS	1,0

20

Jak je vidět z těchto tabulek, všechny upstream oblasti vykazují v podstatě stejnou účinnost po fúzi s promotorem 35S -46, a zdá se, že je zde malý aditivní efekt.

Vysvětlivky k obrázku 1:

- sub = subklon hsp80 (Brassica)
 25 I = BglIII-fragment klonovaný do místa BamHI vektoru
 II = mutageneze in vitro pro vytvoření restrikčních míst BamHI a SphI.

Informace o SEQ. ID. č. 1:

- 30 (i) Charakteristiky sekvence:
 (A) délka: 2042 párů bází
 (B) typ: nukleová kyselina
 (C) počet řetězců: dvouřetězcová
 (D) topologie: lineární

35

- (ii) Typ molekuly: DNA (genomová)

(iii) Hypotetické údaje: žádné

(iv) Pozitivní řetězec: žádný

(xi) Popis sekvence: SEQ. ID. č. 1:

5

ATCGATAACC	ACGACCACGA	CCAAAACCAC	GATTGTGACC	ACGGCCACGA	CCACGCCCAC	60
GATAGGAATA	ATTTCTTTT	TCCGGATTTT	TTATATCCGT	TGCATTTACC	TCAGGAAATG	120
CTTTGGTTCC	CGTGGGTCGG	GCATTGTGGT	TTTAAATGAG	GAGTTCATTA	TTTCTCTCCG	180
CTATTATAAG	CGCCACAGCG	AGTTCAGAGA	ACCTCGTATA	CCCACAATTT	CTATATTGTT	240
CTTGTAAGAAC	ATAATGATTT	TTGTGGAACG	TTTGGTAAGT	TTTCTCGAGC	ATTTCCGCTT	300
CCGAGACAGG	CTTACGCAA	TAATCTAATT	GCGCCGCTAT	TCTCAATATA	GCGGAATTGT	360
ACGTTTCCAC	TTTTTCAAAA	TCTTGAAATC	GTAGATTTTT	CCACTCATCG	AGTGCATGGG	420
GGAGAGTAAT	TTTCTTTTGG	TTATCAAACC	TCTCCTTCAG	AGCTTTCCAA	AGATCTAAGG	480
GATCTTTGGT	TCTCGCATAA	TCATGCGTAA	GATTTTCATC	TAGATGTCCT	CTCAGAAATA	540
TCACGGCCTT	AGCCTTTTCA	TGAGAGGTTG	ATATATTGCC	TTCTCTTATT	GTTTCGAGTA	600
TTTTCTCGGA	ATCTAGATGA	AGCTCCATGT	TTGTAACCCA	TGCCGTGTAG	TTTGTCCAG	660
TTACTTCCAA	TGCCGGAAC	TGAAGTTTCT	CGATTTTTCG	CATTTGTATT	TCTAAAGAAC	720
ATAAATAAAA	ATTATTAGAA	TATTATTCAT	ATTAAAGAA	ACCGTTTACA	TTGATCATGC	780
AAGCAATTAC	AAGGAGAAGC	GATGTAAAGA	AAAGTAAACC	GATATTCATC	CTAAATTCTC	840
TTGGAGTAAA	TTCTCCAACG	GATAAACCAT	AAATAGAAAC	ACAAATAAAA	ATGGCACATA	900
AAAACAAAAG	TGCGCGAATC	ATCTTTCTTG	AAAAAAAAAA	TCGGAAGAGA	GCGATTTGAA	960
ATTTTTGAGA	GAAGATGAAA	TATTTTGGAT	GATGAAATGG	AGTGAAAATG	AGTTGTATTT	1020
ATAGATGAAA	AACACTGTTC	ATAACCGTTG	GAGAAAGGGG	AAATTTTGAA	AAAAATTTCTT	1080
TGTGACCGTT	GGGGTTAAAT	CGAGTGCATC	AAAAATCAGT	CTGAGAATAT	CGTATTAAAC	1140
AGTCAATCAA	ATCTATAAAA	TTTCATAAAA	GTAAAAATTA	TGGCAATGAA	ATATTTATGT	1200
TATGACAACA	AATCATGCGA	CGGCTCAGCC	GATCAATGCA	GAGTAATAAA	TAAATTATAC	1260
GGCGGCTCGG	CCGACCAATT	AATAATAAAC	AGAATATAAG	GCGGCTCGGC	CGACCAATAA	1320
ATAATAAACA	GAATATAAGG	CGGCTCGGCC	GACCATTAAT	AAATTAAATT	ATTAGTAAAT	1380
AATATAGGCG	GTATTCCGGC	CATTATAACA	TAATATAAAT	AATAGTAGAG	GCGGTATACC	1440
GACCATTATA	ACAGGGTATA	AATGATACAA	ATAAATTTTA	CCGAATCGCA	GAGTGATCGT	1500
GCTGATAACG	TGTTATGAAA	ATAACTGAAA	TTTTATTATA	TCGCGGGAAT	TTAAATAAGG	1560
GCAAAATTTT	ATACCCGTAA	AAATTATAAC	ACTGAAAGAA	AGTGTTTATC	TGAGAGAGAA	1620
GGGAAGAGTG	AAGTGTGTTT	TTGAAACGAT	CGAATTGAT	CGTATATATA	AAGAGAAAAAT	1680
CTACTGTGCA	AATAGTGCAG	CGGGCCCCAC	ATCATTTATA	ATTTCAACTT	ATGCGGCGCT	1740
GTGTTCTCTG	ACTTTCATAA	CAAAATTATG	TTATTTGTTT	TAACACAAAA	AAGTAGAAAA	1800
TTATAAAGAA	GAAGAAAAATA	ACACATTGAC	CAAAAAGAAG	TAAATTAGTT	ACACCCCAAG	1860
ATTATTGGGC	CCAACCTGTC	TCAAACCTAAC	AAGTTAAGCA	TAATGGATCT	CAGAAGGATC	1920
TAGAAACCTT	ATAACGTTTG	TGTATATATA	CGTAACTTGT	CTCTTCACTA	CCTCGCATCT	1980
GCTCTCTCTA	TTATCGTACC	TCCTTGATAA	ACCCTAGATC	TCCCCGATTC	TCAGCAACGA	2040
TG						2042

Tabulka 1

10 Promotorová oblast hsp 80

-2030	-2020	-2010	-2000	-1990	-1980
ATCGATAACC	ACGACCACGA	CCAAAACCAC	GATTGTGACC	ACGGCCACGA	CCACGCCCAC
-1970	-1960	-1950	-1940	-1930	-1920
GATAGGAATA	ATTTCTTTT	TCCGGATTTT	TTATATCCGT	TGCATTTACC	TCAGGAAATG
-1910	-1900	-1890	-1880	-1870	-1860
CTTTGGTTCC	CGTGGGTCGG	GCATTGTGGT	TTTAAATGAG	GAGTTCATTA	TTTCTCTCCG
-1850	-1840	-1830	-1820	-1810	-1800
CTATTATAAG	CGCCACAGCG	AGTTCAGAGA	ACCTCGTATA	CCCACAATTT	CTATATTGTT

Tabulka 1 - pokračování

-1790	-1780	-1770	-1760	-1750	-1740
CTTGTAAGAAC	ATAATGATT	TTGTGGAACG	TTTGGTAAGT	TTTCTCGAGC	ATTTCCGCTT
-1730	-1720	-1710	-1700	-1690	-1680
CCGAGACAGG	CTTACCGCAA	TAATCTAATT	GCGCCGCTAT	TCTCAATATA	GCGGAATTGT
-1670	-1660	-1650	-1640	-1630	-1620
ACGTTTCCAC	TTTTTCAAAA	TCTTGAAATC	GTAGATTTTT	CCACTCATCG	AGTGCATGGG
-1610	-1600	-1590	-1580	-1570	-1560
GGAGAGTAAT	TTTCTTTTGG	TTATCAAACC	TCTCCTTCAG	AGCTTTCCAA	AGATCTAAGG
-1550	-1540	-1530	-1520	-1510	-1500
GATCTTTGGT	TCTCGCATAA	TCATGCGTAA	GATTTTCATC	TAGATGTCTT	CTCAGAAATA
-1490	-1480	-1470	-1460	-1450	-1440
TCACGGCCTT	AGCCTTTTCA	TGAGAGGTTG	ATATATTGCC	TTCTCTTATT	GTTTCGAGTA
-1430	-1420	-1410	-1400	-1390	-1380
TTTTCTCGGA	ATCTAGATGA	AGCTCCATGT	TTGTAACCCA	TGCCGTGTAG	TTTGTCCCAG
-1370	-1360	-1350	-1340	-1330	-1320
TTACTTCCAA	TGCCGGAAAC	TGAAGTTTCT	CGATTTTTCG	CATTTGTATT	TCTAAAGAAC
-1310	-1300	-1290	-1280	-1270	-1260
ATAAATAAAA	ATTATTAGAA	TATTATTCAT	ATTAAAAGAA	ACCGTTTACA	TTGATCATGC
-1250	-1240	-1230	-1220	-1210	-1200
AAGCAATTAC	AAGGAGAAGC	GATGTAAAGA	AAAGTAAACC	GATATTCATC	CTAAATTCTC
-1190	-1180	-1170	-1160	-1150	-1140
TTGGAGTAAA	TTCTCCAACG	GATAAACCAT	AAATAGAAAC	ACAAATAAAA	ATGGCACATA
-1130	-1120	-1110	-1100	-1090	-1080
AAAACAAAAG	TGCGCGAATC	ATCTTTCTTG	AAAAAAAAAA	TCGGAAGAGA	GCGATTTGAA
-1070	-1060	-1050	-1040	-1030	-1020
ATTTTGTAGA	GAAGATGAAA	TATTTTGGAT	GATGAAATGG	AGTGAAAATG	AGTTGTATTT
-1010	-1000	-990	-980	-970	-960
ATAGATGAAA	AACACTGTTC	ATAACCGTTG	GAGAAAGGGG	AAATTTTGAA	AAAATTTCTT
-950	-940	-930	-920	-910	-900
TGTGACCGTT	GGGGTTAAAT	CGAGTGCAC	AAAAATCAGT	CTGAGAATAT	CGTATTAAAC
-890	-880	-870	-860	-850	-840
AGTCAATCAA	ATCTATAAAA	TTTCATAAAA	GTAAAAATTA	TGGCAATGAA	ATATTTATGT
-830	-820	-810	-800	-790	-780
TATGACAACA	AATCATGCGA	CGGCTCAGCC	GATCAATGCA	GAGTAATAAA	TAAATTATAC
-770	-760	-750	-740	-730	-720
GGCGGCTCGG	CCGACCAATT	AATAATAAAC	AGAATATAAG	GCGGCTCGGC	CGACCAATAA
-710	-700	-690	-680	-670	-660
ATAATAAACA	GAATATAAGG	CGGCTCGGCC	GACCATTAA	AAATTAAATT	ATTAGTAAAT
-650	-640	-630	-620	-610	-600
AATATAGGCG	GTATTCCGGC	CATTATAACA	TAATATAAAT	AATAGTAGAG	GCGGTATACC
-590	-580	-570	-560	-550	-540
GACCATATA	ACAGGGTATA	AATGATACAA	ATAAATTTTA	CCGAATCGCA	GAGTGATCGT
-530	-520	-510	-500	-490	-480
GCTGATAACG	TGTTATGAAA	ATAACTGAAA	TTTTATTATA	TCGCGGGAAT	TTAAATAAGG
-470	-460	-450	-440	-430	-420
GCAAAATTTT	ATACCCGTAA	AAATTATAAC	ACTGAAAGAA	AGTGTATTATC	TGAGAGAGAA
-410	-400	-390	-380	-370	-360
GGGAAGAGTG	AAGTGTGTTC	TTGAAACGA	CGAACTTGAT	CGTATATATA	AAGAAAAAAT

Tabulka 1 - pokračování

-350	-340	-330	-320	-310	-300
CTACTGTGCA	AATAGTGCAG	CGGGCCCCAC	ATCATTTATA	ATTCAACTT	ATGCGGCGCT
-290	-280	-270	-260	-250	-240
GTGTTCTCTG	ACTTTCATAA	CAAAATTATG	TTATTTGTTT	TAACACAAAA	AAGTAGAAAA
-230	-220	-210	-200	-190	-180
TTATAAAGAA	GAAGAAAATA	ACACATTGAC	CAAAAAGAAG	TAAATTAGTT	ACACCCCAAG
-170	-160	-150	-140	-130	-120
ATTATTGGGC	CCAACCTGTC	TCAAATAAC	AAGTTAAGCA	TAATGGATCT	CAGAAGGATC
-110	-100	-90	-80	-70	-60
TAGAAACCCT	ATAACGTTTG	TGTATATATA	CGTAACCTGT	CTCTTCACTA	CCTCGCATCT
-50	-40	-30	-20	-10	-1
GCTCTCTCTA	TTATCGTACC	TCCTTGATAA	ACCCTAGATC	TCCCCGATTC	TCAGCAACG
+1					
ATG					

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. DNA-konstrukt, který obsahuje

(a) promotor o délce 1568 párů bází se sekvencí nukleotidů 472 až 2039 ze SEQ. ID. č. 1, nebo konstitutivní promotor, který je deletovaným derivátem tohoto promotoru, vybraný ze skupiny zahrnující promotor 602 Δ 3-2, definovaný v tabulce v příkladu 3 jako promotor hsp80, ze kterého byly deletovány oblasti -1568 až -1000 a -488 až -134, a promotor 602 Δ 4-9, definovaný v tabulce v příkladu 3 jako promotor hsp80, ze kterého byly deletovány oblasti -1548 až -628 a -488 až -134, a

(b) heterologní kódující sekvenci operabilně spojenou s regulační oblastí uvedenou v bodě (a).

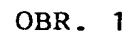
2. Způsob regulace exprese heterologního genu v eukaryotickém hostiteli konstitutivním způsobem, **vyznačující se tím**, že se

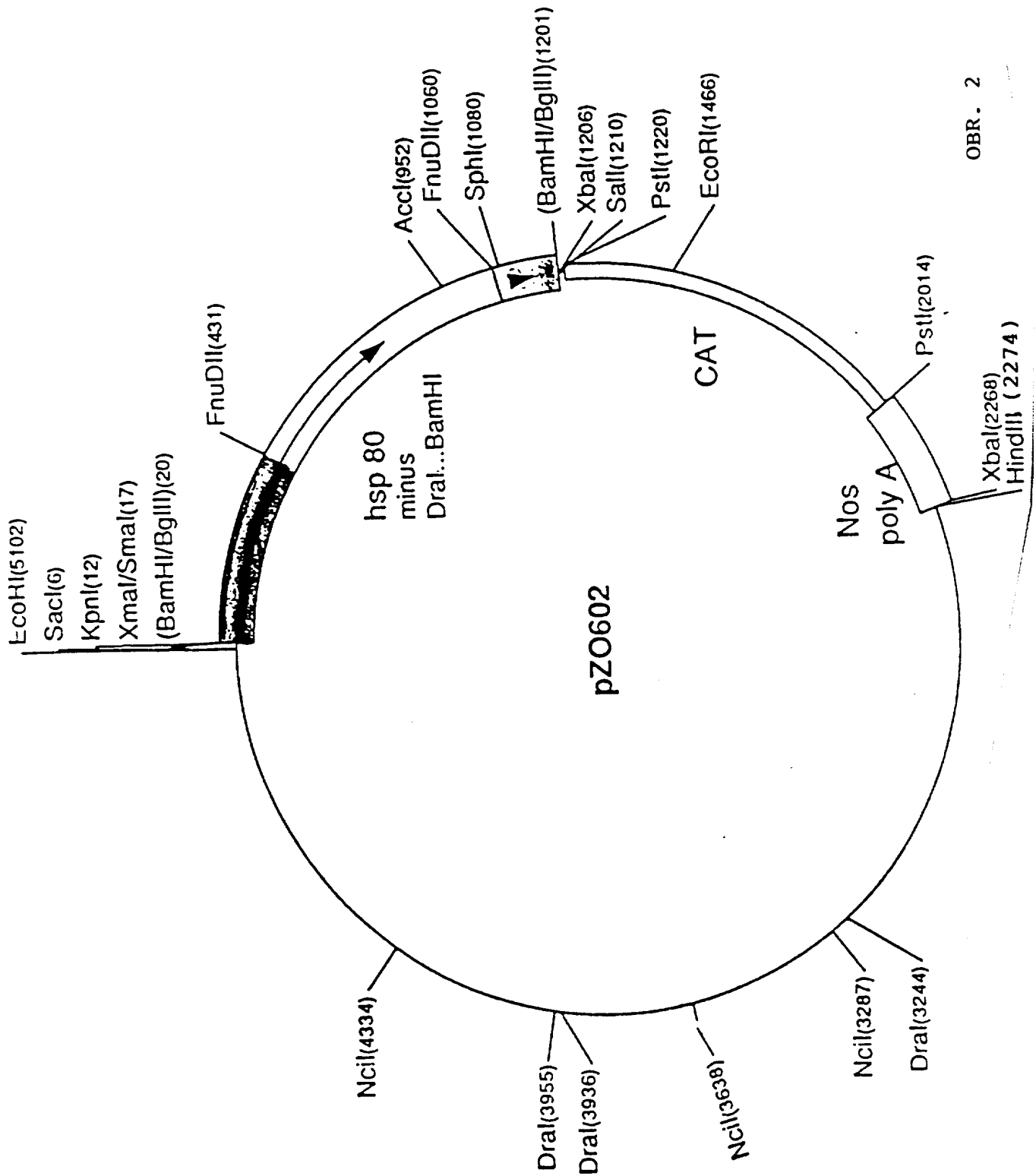
- (a) transformují rostlinné buňky nebo protoplasty DNA-konstruktem podle nároku 1,
 (b) vyberou se rostlinné buňky nebo protoplasty, které byly transformovány,
 (c) uvedené rostlinné buňky nebo protoplasty se regenerují, a
 (d) vybere se transformovaná rostlina, která exprimuje uvedený heterologní gen.

3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že uvedená heterologní kódující sekvence je získána z genu vybraného ze skupiny zahrnující insekticidní geny, geny rezistence vůči herbicidům, antimikrobiální geny, antifungální geny a antivirové geny.

4. Způsob podle nároků 2 nebo 3, **vyznačující se tím**, že uvedeným eukaryotickým hostitelem je buňka nebo protoplast dvouděložné rostliny.

2 výkresy





OBR. 2

Konec dokumentu