



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **95-00988**

(22) Data de depozit: **30.11.1993**

(30) Prioritate: **30.11.1992 US 07/985695;**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.12.1997 BOPI nr. **12/1997**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr. **GB 93 / 02462 30.11.1993**

(87) Publicare internațională:
Nr. **WO 94/12622 09.06.1994**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
J. of Biological Chemistry 1991, vol. 266,
nr. 35 și 1957, vol. 227, nr. 151

(71) Solicitant: **ZENECA LIMITED, LONDRA, GB;**

(73) Titular: **ZENECA LIMITED, LONDRA, GB;**

(72) Inventatori: **DATTA ASIS, NEW DELHI, IN; DUNWELL JAMES, BERKSHIRE, GB; MEHTA**
ANURADHA, NEW DELHI, GB; NATARAJAN K., NEW DELHI, IN;

(74) Mandatar: **ROMINVENT S.A. (AGENȚIE PENTRU BREVETE, DESENE, MĂRCI ȘI TRANSFER**
TEHNOLOGIE) BUCUREȘTI

(54) **SECVENȚĂ ADN CE CODIFICĂ OXALAT DECARBOXILAZA**

(57) **Rezumat:** Prezenta invenție se referă la secvența de ADN care codifică enzima oxalat decarboxilaza, precum și variante ale acesteia, obținute prin degenerarea codului genetic; secvența de ADN este utilizată pentru protecția plantelor la atacul acidului oxalic, prin aplicarea oxalat decarboxilazei în combinație cu un purtător adecvat, acceptat în agricultură ca agent de protecție a plantelor

la atacul acidului oxalic, prin încorporarea în genomul plantei și transformarea ADN-ului ce codifică oxalat decarboxilaza, precum și a regiunilor de inițiere și de terminare, care reglează exprimarea acestuia, obținându-se astfel o celulă de plantă transformată, precum și o plantă recombinată.

Revendicări: 3

RO 112764 B1



Prezenta invenție se referă la secvența de ADN ce codifică oxalat decarboxilaza, utilizată în protecția plantelor la atacul acidului oxalic.

Este cunoscut faptul că cea mai mare parte a oxalatului de la animale, inclusiv oameni își are originea în oxalatul ingerat cu material vegetal. Unele legume cu frunze mari (de exemplu, *Amaranthus*, spanac, revent) sunt surse bogate de vitamine și minerale, dar ele conțin acid oxalic ca factor nutrițional stresant. Astfel de plante, când sunt consumate în cantități mari devin toxice pentru oameni datorită chelaților de oxalat de calciu și precipitării oxalatului de calciu în rinichi ceea ce are ca urmare hiperoxalurie și distrugerea țesuturilor renale (Decastro, J. Pharm. Biomed. Anal. 6:1 (1986); Hodgkinson, Clin. Chem. 16,547 (1970)). În afară de acestea pot fi amintite cel puțin alte două situații când acidul oxalic este implicat în mod indirect. Într-un caz producerea acidului oxalic este un mecanism important de atac utilizat de către *Whetziinia sclerotiorum*, o ciupercă ce produce daune serioase culturilor cum ar fi floarea-soarelui. Acidul oxalic se acumulează în țesuturile infectate în timpul patogenezei timpurii și concentrația sa crește în perioada când patogenul colonizează țesuturile gazdă. Acumularea acidului oxalic în frunze producând simptome de vestejire și eventual moartea frunzei. Astfel, acidul oxalic funcționează ca o toxină mobilă ce se deplasează de la baza stemurilor xilenului de legătură și frunze. (Maxwell, Physiol. Plant Pathol. 3:279 (1973)).

În alt caz, consumul de *Latimus sativus* (măzărichea puiului) produce neurolatirism, care se caracterizează prin spasticitatea mușchilor picioarelor, paralizia membrelor inferioare, convulsii și moarte. *L. sativus* este o legumă puternic bogată într-o proteină care crește în condiții extreme, precum locuri expuse curenților de aer și suprafețelor mlăștinoase și nu necesită practici complexe de conducere. În diferite părți ale plantei este prezentă neurotoxina acid β -N-oxalil-L- α , β -diaminopropionic (ODAP). Sinteza ODAP este o reacție în două etape în care acidul oxalic

este un substrat de start esențial. ODAP acționează ca un antagonist metabolic al acidului glutamic care este implicat în transmiterea impulsurilor nervoase în creier. Așadar, în ciuda conținutului sau bogat în proteine, leguma nu poate fi folosită ca sursă alimentară (Mickelson et al., (1973) în Modern Nutrition in Health and Disease: Dietotherapy (Goodhart, R. S. and Shils, M. E., Eds) Sth Ed. pp.412-433, Lea and Febiger, Philadelphia).

Un studiu al funcției acidului oxalic în sistemele menționate anterior evidențiază rolul său drept un factor de stres important. Este evidentă valoarea unei gene izolate care să codifice un produs proteic care să degradeze acidul oxalic. O astfel de genă poate fi folosită ca un instrument pentru degradarea acidului oxalic în plantele unde el se acumulează ca atare sau este un substrat în sinteza neurotoxinei sau este un mediu pentru patogenează. Aceasta se poate obține numai prin efectuarea transferului genetic la aceste plante.

De un interes deosebit este sistemul enzimatic cunoscut, care degradează acidul oxalic, oxalat decarboxilaza de la ciuperca *Bazidiomiceta Collubia velutipes* datorită unei lucrări care folosește o enzimă parțial purificată arată o singură etapă pentru degradarea acidului oxalic la dioxid de carbon și acid formic, un acid organic lipsit de toxicitate în absența oricărui cofactor (Shimozono et al., J Biol. Chem. 227:151 (1957)).

Problema pe care o rezolvă invenția este secvența de ADN care codifică oxalat decarboxilaza utilizată în protejarea la atacul acidului oxalic.

Secvența de ADN, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate prin aceea că, secvența ADN care codifică oxalat decarboxilaza, are secvența de nucleotide prezentată în fig. 11, precum și variante ale acesteia obținute prin degenerarea codului genetic.

De asemenea, prezenta invenție asigură metode de utilizare a secvenței de codificare a pentru producerea plantelor transgenice care au un conținut scăzut

de acid oxalic. Într-o astfel de realizare, invenția de față, face posibilă ameliorarea condițiilor de stres generate de acidul oxalic în cazurile menționate mai sus. Ea face posibilă, de asemenea, dezvoltarea sistemelor de cercetare pentru urmărirea nivelurilor deoxalaților în urină și ser.

În prezenta invenție, se prezintă introducerea unei gene care exprimă oxalat decarboxilaza în plante (inclusiv plante cultivate cum ar fi: floarea-soarelui, soia, fasole în general, rapiță/lucernă, safflower, arahide și trifoi, legume cultivate cum ar fi: lăptuca, tomate, cucurbitacee, cartofi, morcovi, ridichi, mazăre, linte, conopidă și varză de brussel, flori precum petunia și pyrethrum și specii de pomi cum ar fi piersic), prin care se conferă la astfel de plante rezistență la boli, în special boli cauzate de fungi, în care acidul oxalic joacă rol principal, așa cum este cazul în bolile datorate genurilor de fungi *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Pythium*, *Paxillus*, *Mycena*, *Leucostoma*, *Rhizoctonia* și *Schizophyllum*.

În linii mari, prezenta invenție, este orientată spre utilizarea unei enzime care degradează oxalat, așa cum s-a exemplificat prin oxalat decarboxilaza, pentru utilizări comerciale, cum ar fi industria berii, sau pentru utilizări agronomice, cum ar fi reducerea susceptibilității unei plante față de acidul oxalic sau pentru a reduce concentrația endogenă de acid oxalic dintr-o plantă. Enzima oxalat decarboxilaza care degradează oxalatul poate fi folosită pentru reducerea mortalității plantelor sau distrugerii datorate bolilor sau altui fenomen în care acidul oxalic joacă un rol invaziv critic. Producerea oxalat decarboxilazei poate avea ca rezultat prevenirea mortalității plantelor și infecțiilor de la bolile în care acidul oxalic este critic. Asemenea boli sunt provocate, în special, printre altele, de genurile specifice de fungi, notate mai sus.

Aici este expusă invenția oxalat decarboxilazei substanțial purificate și caracterizate. Enzima are un pH acid, este stabilă pe un domeniu larg de pH și este moderat termostabilă. Greutatea moleculară a enzimei pe SDS-PAGE este 64 kDa în stare glicozilată și 55 kDa în stare

deglicozilată.

De asemenea, aici se expune invenția unei gene substanțial integrală și substanțial pură, care codifică enzima oxalat decarboxilaza cu o secvență ADN specifică precum cea prezentată în secvența ID nr.1. Gena ce codifică enzima care prezintă activitate oxalat decarboxilaza având o greutate moleculară (deglicozilată) de aproximativ 55 kDa, așa cum s-a determinat prin SDS-PAGE.

Invenția se referă, de asemenea, la compoziții pentru utilizarea pentru combaterea patogenzei plantei, compoziții care includ substanțe chimice ce prezintă activitate de degradare a acidului oxalic, în mod deosebit, activitate oxalat decarboxilazică. În mod specific, compusul are activitate oxalat decarboxilazică într-o cantitate suficientă pentru descompunerea acidului oxalic produs de patogeni. Se va aprecia că o altă utilizare agrochimică pentru un asemenea compus este aceea de a combina cu un purtător corespunzător, care este acceptabil agronomic, permițând eliberarea compusului direct către plantă sau către sol.

Aici, este descrisă, de asemenea, o celulă transformată de plantă, celulă care este transformată cu o genă care codifică oxalat decarboxilaza. Gena care codifică o astfel de enzimă poate include secvența ADN menționată, Secvența ID nr. 1.

Este descrisă aici o metodă pentru asigurarea protecției împotriva acidului oxalic pentru o plantă care are nevoie de o asemenea protecție. Metoda include furnizarea la o plantă care are nevoie de o astfel de protecție, a unei enzime care degradează acidul oxalic într-o cantitate suficientă pentru efectuarea unei asemenea protecții. De preferință, se are în vedere că enzima care degradează acidul oxalic este oxalat decarboxilaza codificată printr-o genă ce are secvență menționată în Secvența ID nr. 1. Metodologia pentru asigurarea unei asemenea protecții poate lua o multitudine de forme inclusiv transformarea unei plante cu o genă care codifică o enzimă ce degradează acidul oxalic și, în special, care codifică oxalat decarboxilaza. Alternativ, metoda poate

include furnizarea unei enzime care degradează acidul oxalic în combinație cu un purtător agronomic acceptabil pentru aplicare directă la o plantă sau la solul în care crește planta.

Oxalat decarboxilaza purificată a acestei invenții, utilizează ca agent de luptă contra patogenzei și utilizarea sa în transformarea celulei de plantă asigură o metodă de combatere a bolilor plantelor, fie în timpul prognozei, fie la stadiul de invazie. Această invenție aduce o speranță deosebită datorită faptului că principala calamitate a plantelor de importanță agricolă cultivate comercial, de exemplu, plante de cultură cum ar fi floarea soarelui, este produsă de specii de fungi precum *Sclerotinia* care secretă acid oxalic.

Dacă se va folosi o aplicare externă a enzimei pentru protejarea unei plante sau părți a unei plante față de patogen, enzima se poate dilua pentru a forma o soluție sau suspensie lichidă, sau se poate amesteca cu un diluant solid pentru aplicarea ca pulbere. Natura precisă a aplicării va depinde în parte de patogenul (ii) particular (i) și planta (1e) avută în vedere. Metode detaliate pentru adaptarea metodelor generale de aplicare la plante cultivate specifice și patogeni specifici se pot găsi în "Methods for evaluating pesticides for control of plant pathogens" K. D. Hickey, ed., The American Phytopathological Society, 1986. Adjuvanții care se pot adăuga formulării includ agenții auxiliari de solubilizare, agenți de umectare și stabilizatori, sau agenți de producere a produselor microcapsulate. Astfel de adjuvanți sunt binecunoscuți în domeniu.

Aplicările externe pot să utilizeze, de asemenea, microorganisme recombinante, fie într-o formă viabilă, fie după convertire, într-o formă neviabilă printr-o metodă care să nu inactiveze enzima.

Purificarea oxalat decarboxilazei de la *C. Velutipes* ca și caracterizarea enzimei izolate se descriu în exemplele de mai jos. S-au separat două forme ale enzimei prin localizare cromatografică. Cele două izoenzime s-au arătat a fi înrudite prin compoziția de aminoacizi, configurație peptidică și reactivitate imunologică.

Maximul A care s-a eluat la pH 3,3 s-a folosit pentru studii ulterioare; K_m s-a găsit a fi de 4,5 mM și V_{max} a fost 166 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Masa moleculară a subunității enzimei glicozilate este 64 kDa, în timp ce masa proteinei deglicozilate este 55 kDa. Enzima prezintă un pH acid, este foarte stabilă pe un domeniu larg de pH și este moderat termostabil.

Gena care codifică oxalat decarboxilaza derivată de la fung având secvența arătată în Secvența ID nr: 1, a fost clonată așa cum s-a descris în exemplele care urmează. Pe scurt, cADN-ul care codifică enzima s-a obținut imunocreeing de la o bancă de expresie λ gt11. Translatarea in vitro a mARN-ului hibrid selectat a dat o proteină de 55kDa. Hibridizarea genomică Southern a arătat că oxalat decarboxilaza este codificată printr-o genă unică. Sonda cADN a hibridizat la o singură specie de mARN de 1,5 kb. S-a dovedit că mARN-ul este indus prin acid oxalic. S-a observat o relație temporală între activitatea enzimatică și nivelurile mARN, arătând că expresia oxalat decarboxilazei este reglată la nivel transcripțional.

Gena care are structura Secvenței nr. 1, conținând secvența de codificare pentru enzima matură oxalat decarboxilaza se poate atașa la elementele genetice reglatoare care sunt necesare pentru expresia unei gene structurale într-o celulă gazdă definită. Primul tip de element reglator necesar este o regiune promotoare de genă care conține secvențe ADN recunoscute de către dispozitivele biologice ale celulei plantei și care induce transcripția secvenței ADN într-un ARN mesager (mARN). Apoi se translatează ARN-ul într-un produs proteic codificat de către regiunea structurală a genei. Promotorul este atașat în fața sau la 5'-ul genei pentru oxalat decarboxilaza, ceea ce se poate realiza conform metodelor standard cunoscute în domeniu. Vezi, de exemplu, Maniatis et al., (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 104-106.

Regiunile promotor care se pot folosi pentru expresia genei oxalat decarboxilaza în celulele de plantă includ pro-

motori care sunt activi într-un domeniu larg al diferitelor țesuturi vegetale. De exemplu, promotorul 35S de la virusul mozaicului conopidei, poate fi adecvat acestui scop. Alt tip de promotor ce se poate folosi în celule de plantă este unul dintre cei care se exprimă în condiții mai restrictive. Incluzi în această clasă sunt promotorii activi numai într-un anumit țesut sau anumite țesuturi ale plantei și/sau induși spre a fi activi prin anumiți stimuli cum ar fi rănirea. Un exemplu de acest tip de promotor este regiunea 5' de la gena pentru gena fenilamoniac liază (PAL). Acest tip de promotor care este prezentat în Liang et al., (1989), PNAS, USA, 86:9284-9288. Expresia genei oxalat decarboxilaza în gazde bacteriene poate fi obținută prin folosirea promotorilor obținuți din surse bacteriene. Exemplele de asemenea promotori includ promotorul tip pentru expresie în bacterii precum *E. Coli*, așa cum s-a exemplificat în Amann et al., (1983). Gene 25:167-168, sau promotorul gliceraldehid fosfat dioxidrogenaza (GAPD) pentru expresie în drojdie, așa cum s-a exemplificat în Edens et al., (1984), Cell 37:629-633. Secvențele promotor de gene pot fi, de asemenea, derivate parțial sau în întregime de la secvența promotor găsite în celule, altfel, decât ale celulei gazdă, cu condiția ca ei să îndeplinească condițiile de mai sus pentru transcripție și translație.

Un al doilea element genetic regulator care poate fi dorit, dar nu neapărat necesar, atașat la gena oxalat decarboxilaza, este o secvență terminator sau secvență de poliadenilare care promovează eficient terminarea transcripției genei, și la eucariote promovează, de asemenea, poliadenilarea, adică adăugarea unui număr oarecare de adenozin nucleotide la capătul 3' al mARN-ului. Pot fi folosite pentru a atașa regiunea terminator în urma sau la 3'-ul genei metode standard cunoscute în domeniu. (Vezi, de exemplu, T. Maniatis et al., de mai sus pp. 104-106). O secvență de o astfel de secvență terminator/poliadenilare pentru expresie în plante este cel de la gena octopin sintaza de la un plasmid Ti

de la *Agrobacterium tumefaciens* cum s-a enunțat în DeGreve et al., (1982). J. Mol. Appl. Genet. 1:499-511. Un exemplu de asemenea terminator pentru expresie în gazde bacteriene este secvență terminatoare de transcripție rho-independentă de la *Salmonella typhimurium*, vezi, de exemplu, E.E. Winkler, (1987), "Escherichia coli and Salmonella Typhimurium, Cellular & Molecular Biology", F. C. Neidhardt, editor; American Society for Microbiology. Secvențele terminator de gene pot fi derivate, de asemenea, parțial sau în întregime, de la secvențe terminator găsite în cele ale celulei gazdă care au aceeași lungime și îndeplinesc criteriile de mai sus pentru terminarea transcripției și poliadenilării cerută de către celula gazdă.

Alt tip de element regulator care poate fi atașat la genă pentru oxalat decarboxilaza este o secvență ADN, care codifică un semnal peptidic. Semnalul peptidic se atașează la terminusul amino al proteinei și permite proteinei să se localizeze la peretele celular sau să fie secretat din celula gazdă. În timpul acestui proces de localizare, peptida semnal este clivată producând un produs proteic cu secvența proteinei mature. Secvența ADN pentru semnalul peptidic se inserează între promotor și regiunea codificatoare. Se pot folosi pentru atașarea secvenței ADN pentru semnalul peptidic metode standard cunoscute în domeniu (vezi, de exemplu, Maniatis, T., et al., de mai sus, pp 104-106). Exemple, de asemenea, secvențe semnal, includ semnalul peptidic de la o genă extensivă a plantelor (Chen & Verner, 1985, EMSO J.4 2145-2151) de la gena bacteriană pe1B (pectatliaza) de la *Erwinia carotovora* (Lei et al., (1987), J. Bacteriol, 169:4379) și de la preprofactorul de drojdie (Smith et al., 1985, Science 229:1219-1229). Secvențele semnal peptidic pot fi derivate, de asemenea, în întregime sau parțial de la secvențe semnal găsite în celulele diferite de cele ale celulei gazdă, care au aceleași lungimi și îndeplinesc condițiile de mai sus pentru prelucrarea și localizarea proteinei în celula gazdă.

Pentru inserția genei oxalat decarboxilaza poate fi folosită oricare dintre diferitele metode cunoscute pentru introducerea genelor străine în plante. Metodologia aleasă pentru realizarea transformării plantei cu gena oxalat decarboxilaza este în funcție de planta gazdă. Ca exemplu, o metodologie bine caracterizată ce ar fi utilă pentru transformarea plantei cu gena oxalat decarboxilaza este transformarea mediată de *Agrobacterium*.

Transformarea mediată de *Agrobacterium* folosind gena oxalat decarboxilaza urmează procedurile bine cunoscute pentru această metodologie. Inițial, se introduce o casetă genetică adecvată pentru expresie în plantă se introduce o tulpină inofensivă de *Agrobacterium tumefaciens* ca gazdă intermediară. Caseta genei oxalat decarboxilaza se introduce în regiunea T-ADN a unei plasmide recombinante care conține un marker genetic detectabil cum ar fi, o genă codificatoare pentru neomicin fosfotransferază, fosfotricinacetiltransferaza sau altele asemenea. Această metodologie este menționată în numeroase publicații în literatură, inclusiv Horsch et al., (1985), Science 227:12x29-1231. Bucăți de țesut de plante, de exemplu, frunză, cotiledon sau hipocotil se coincubează cu bacterii timp de 2-3 zile înainte de a se omorî bacteriile, folosind antibiotice precum carbenicilina. Suplimentar, se includ în mediul de cultură pentru țesuturile vegetale, antibiotice corespunzătoare markerului genetic selectabil folosit, astfel, încât să crească celulele de plantă transformată.

S-au regenerat plantele de la celulele transformate și apoi s-au testat pentru prezența și expresia genei oxalat decarboxilaza. Pentru identificarea transformanților virali se pot folosi imunocercetări și teste pentru activitate oxalat decarboxilazică. De asemenea, ca un test funcțional al țesuturilor intacte se poate folosi toleranța la acid oxalic exogen.

Așa cum s-a notat pentru transformarea plantei în afară de transformarea *Agrobacterium* sunt accesibile câteva alte metodologii. Exemple ale câtorva astfel de metodologii de eliberare a ADN-ului includ electroporarea, adică eliberarea indusă

chimic prin protoplaste microinjectare, balistică precum și altele. Un exemplu de tipuri de plante care nu sunt în mod special corespunzătoare transformării mediate de *Agrobacterium* sunt soia și anumite cereale, inclusiv porumbul. Aceste plante vor putea beneficia în înțrîgime de încercările de transformare a plantelor folosind alte metodologii decât transformarea mediată de *Agrobacterium*.

Avantajele prezentei invenției constă în utilizarea genei ce codifică oxalat decarboxilaza pentru transformarea plantelor pentru ca acestea să-si sintetizeze singure gena oxalat decarboxilaza sau prin aplicarea de oxalat decarboxilaza ca pesticid, cel mai probabil, în combinație cu un purtător adecvat ce este acceptabil în agricultură. Un beneficiu important al utilizării ca pesticid este cel ecologic, aceasta fiind nepoluantă și nedăunătoare plantelor.

În continuare, se prezintă exemplele de realizare a invenției, în legătură cu fig. 1-12 care reprezintă:

- fig. 1, Profilul de eluție al oxalat decarboxilaza din coloana de cromatofocusare. Proteina de la etapa Acetonă-IV s-a încărcat într-o coloană DEAE-Sepharoză CL-6B (1 x 13 cm) echilibrată cu acetat de potasiu 0,02M (pH 4,5). Proteinele legate s-au reluat cu un gradient de pH descrescător. Activitatea a fost asociată cu maximul de eluție A la pH 3,3 și maximul de eluție B la pH 2,5. Incluse, benzile proteice corespunzătoare celor două maxime. Maximele A (traseu A) și B (traseu B) s-au stabilit prin SDS-PAGE 11% și s-au colorat cu Coomassie Blue. Traseul S prezintă markerii moleculari de masă de la Sigma(SDS-7).

-fig. 2, Criterii de puritate. (A) S-au separat pe gradient SDS-14 7-15% de două ori diluții seriale (traseele 1 la 7) de oxalat decarboxilaza începând cu 3μg proteină (traseul 1). (B) Sau separat prin focalizare izoelectrică 10μg de oxalat decarboxilaza (maxim A) (pH 2,5-5,0 amfotili Pharmacia) în dimensiunea inițială și prin SDS-PAGE 12% în cea de-a doua dimensiune. Traseul S arată standele de calibrare SDS-7 (Sigma) pentru estimarea

greutății moleculare. În (A) și (B) gelurile s-au colorat cu Coomassie Blue.

- fig. 3, Corelarea activitate-bandă. S-au supus electroforezei 500 ng proteină în două trasee de gel poli(acrilamidic 6% nederat; un traseu s-a colorat cu Coomassie Blue s-a decupat în 12 secțiuni de câte 4mm. Fâșiile de gel s-au incubat în 200μg de tampon acetat de potasiu 0,1 pH 4,5. Acrilamida s-a sfărâmat și s-a umezit peste noapte la 4°C. Activitatea enzimatică s-a cercetat și s-a corelat la banda din traseu colorat. Distanța migrată (R_f de 0,35, fâșia de gel nr.4) de activitate enzimatică (0,2 unități) s-a corelat cu cea a benzii unice colorate (500 ng). Nu s-a găsit nici o bandă proteică sau activitate enzimatică în nici o altă parte a gelului.

- fig. 4, Comparatie a modelelor digestului Cleveland de la două forme de oxalat decarboxilaza. S-au generat hărțile peptidice direct în gel pentru depozitare 4,5% al unui gel de separare 14%. S-au tăiat 10 μg din polipeptidele maximului A și maximului B din gelul SDS-poli(acrilamidic 11%, și s-au digerat cu 100μg/ml protează V8 (*S. Aureus*, Sigma). Peptidele s-au electropotat la o membrană nitrocelulozică și s-au imunodetectat cu diluție 1:5000, de anticorp anti-oxalat decarboxilaza. Trasee: 1, maximul A al proteinei 1 și 2, maximul B al proteinei.

-fig. 5, Deglicozilarea oxalat decarboxilazei. S-a tratat 1μg din maximul enzimatic A cu 1 mU (traseu 3) și 10 mU (traseu 4) de EndoH timp de 22 h și s-au separat în SDS-PAGE 11%. Traseele 1 și 2 conțin controale netratate pentru maximul A. Traseul S (dreapta) arată markeri de greutate moleculară (Pharmacia) și traseul S (stânga) are greutatea moleculară cea mai ridicată, markerii precolorați (BRL).

- fig. 6, Imunotitrarea activității enzimei. S-au incubat 1,5 μg de enzimă în tampon acetat de potasiu 0,02M. pH 4,5 cu diferite volume de ser (1) la 25°C, timp de 2h. Imunocomplexele s-au scos prin centrifugare la 12000 xg timp de 10 min. și s-a determinat activitatea reziduală prin test standard. Incubarea controlului s-a realizat cu ser preimun (Pi).

- fig. 7, (A) fuziunea proteinelor oxalat decarboxilaza-β-galactozidază. S-au lizat microplăcile induse IPTG în tampon Laemmli 1% și s-au separat pe SDS-PAGE 10%, s-au transferat la nitroceluloză și s-au sondat cu anticorpii anti-oxalat decarboxilaza. Numerele traseelor de sus corespund la clonele numerele "C" este traseul de control cu macroplaca de la non-recombinat. (B) Hibridizarea diferențială a ARN-urilor de la plăcile imunopozitive. Fagul ADN (500ng) izolat de la clone a fost legat la membrană Gene Screen Plus în duplicat și s-au hibridizat cu oxalat neindus (minus) și oxalat-indus sonde cADN (2,5 x 10⁸ cpm/μg cADN). "C" se referă la ADN nerecombinant λ gtl.

- fig. 8, (A) Translare *in vitro*. S-au imunoprecipitat și s-au separat prin SDS-PAGE 10% produsele de translare ale ARN poli (A+) neinduse translatate total *in vitro*, O-h (traseul 1) și stadiile induse oxalat (traseul 2), 12-h. Gelul s-a fluorografiat și autoradiografiat. Traseul 3 arată dispariția benzii de 55 kDa când oxalat decarboxilaza purificată a fost prezentată drept competitor pentru legare la anticorp în timpul imunoprecipitării. (B) Translarea hibrid-selectivă. ARN poli (A+) (20μg/ml) izolat de la *C. velutipes* s-a hibridizat cu plasmid ADN (1,2 kb insert cADN în pTZ18U) legat la membrană Gene Screen Plus. ARN-ul s-a eluat și s-a translatat în lizat reticulocitar de iepure și produsele translatate s-au imunoprecipitat și s-au separat prin SDS-PAGE 10%. Traseul 1 nici un mARN; traseul 2, mARN hibrid selectat de la insertul 1,2 -kb; traseul 3 ARN poli(A+) total 12-h; și traseul 4 secvențele vectorului nerecombinat. Este indicată masa moleculară a markerilor.

- fig 9, (A) Northern blot care arată mARN de 1,5 kb de la oxalat decarboxilaza de la *C. velutipes*. 1 μg ARN poli (A+) de la stadiile neinduse (h) și de la stadiile oxalat induse (12h) au fost glixat denaturate și s-au separat pe gel de agaroză 1,2%, s-au pătat la membrană Gene Screen Plus și s-au sondat cu cADN marcat -(α³²P) (9 x 10⁷ cpm/μg) pentru oxalat decarboxilaza. S-a utilizat ca standard de mărime etalon de 1kb (BRL).

(B) Southern blot al ADN genomic de la *C. velutipes*. S-a digerat ADN genomic (4 µg), cu enzime de restricție s-a separat pe gel de agaroză 1,2%, pata s-a transferat la membrana Gene Screen Plus și s-a hibridizat cu insertul cADN marcat - ($\alpha^{32}\text{P}$). Ca standarde de mărime moleculară s-au utilizat digerate $\lambda\text{HindIII}/\text{EcoRI}$ și UCI9Hinfl.

- fig. 10, Reglarea expresiei genei oxalat decarboxilazei. Se prezintă ARN-ul total (10 µg) izolat din cultură de *C. velutipes* în diferite momente după adăugarea acidului oxalic. (A) Gel agaroză 1,2% colorat cu bromură de etidiu arată încărcări relative de ARN glioxal denaturat. (B) ARN-ul total transferat la Gene Screen Plus și hibridizat la insertul cADN 1,2 marcat - ($\alpha^{32}\text{P}$). Cantitatea relativă a ARN poli (+A) care codifică oxalat decarboxilaza (O) de la ariile integrate ale traseului densitometric de la autoradiografia (B). Activitatea specifică a enzimei izolate din aceeași cultură este, de asemenea, prezentată[.].

- fig. 11, Secvența nucleotidică a insertului cADN de 1420 bp în pOXD1.

- fig. 12, Construcția plasmidului pSR21.

Exemplul 1. Purificarea și caracterizarea oxalat decarboxilaza

Protocoloalele experimentale:

Organismul și condiții de creștere

Se crește *C. velutipes* (tulpina S. A.T.C.C. 13547) pe suprafața mediului care conține dextroză 5%, peptonă 1%, KH_2PO_4 0,1%, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% și extract de malt Difco 1% la pH 5,2. Organismul se crește de la inoculare de miceliu la 25°C, în culturi staționare într-un volum de mediu reprezentând 1/5 din volumul baloanelor de cultură. După circa 25 zile de la inoculare se induce enzima oxalat decarboxilaza prin adăugare de acid oxalic 12,5 mM la fiecare vas de cultură. Se recoltează miceliul după 2-3 zile de la adăugarea acidului oxalic și miceliul se spală cu apă distilată rece și se depozitează la -20°C. *C. velutipes* se menține pe același mediu înclinat (Lakoby, Methods in Enzymology 5:637 (1962)).

Purificare:

Etapa 1. Prepararea extractului brut

Miceliul înghețat se macină într-un amestecător Waring timp de 10 min. cu gheață uscată sau azot lichid. Pudra se extrage cu 3 volume tampon citrat de potasiu 0,1 M, pH 3,0, timp de 10 min. la 4°C și suspensia se centrifughează la 10000 x g, timp de 30 min. la 4°C. Supernatantul se filtrează printr-un strat dublu de tifon.

Etapa 2. Precipitare cu acetonă

Se adaptează concentrațiile de acetonă după Shimozo și Hayaishi (J. Biol. Chem. 227:151 (1957)), exceptând faptul că ultimele două etape s-au realizat. Procentajele cuantificate sunt pe bază de vol/vol asumând volumele adiționale. (a) temperatura scăzută pentru precipitarea acetonică se menține la -10°C printr-o baie gheață-sare. Proba se răcește până la 0°C și prima precipitare acetonică la 33,3% se obține prin adăugare în picătură de acetonă răcită la supernatant cu agitare mecanică constantă (Acetonă I). Amestecul se echilibrează timp de 15 min. și precipitatul format prin centrifugare într-o centrifugă prerăcită la 10000 x g, 20 min. la 2°C. Precipitatul obținut de la fracționarea 33,3%-50% în 1/5 din volumul de strat al tamponului acetat de potasiu 0,1M răcit și la pH 4,5 soluția enzimatică se dializează timp de 16h la 4°C contra de 2 ori schimbat tamponul acetat de potasiu 0,02 M, pH 4,5 și o mică cantitate de precipitat format în timpul dializei se îndepărtează prin centrifugare (Acetona II). (b) Supernatantul se aduce la 40% acetonă (Acetonă III) și precipitatul se îndepărtează. Precipitatul de la adăugarea ulterioară până la 50% (acetonă) se dizolvă într-un volum de acetat de potasiu 0,02M, pH 4,5.

Etapa 3. Focalizarea cromatografică

Se echilibrează și se folosește pentru pregătire o coloană de 10 ml de DEAE-Sepharoză CE-68 (Pharmacia) (1 x 13cms) în tampon acetat de potasiu 0,02M pH 4,5. Precipitatul de la ultima precipitare acetonică se încarcă la o rată de curgere de 10 ml/h. Se spală coloana

cu două volume de coloană de acetat de potasiu 0,02M pH 4,5 și se efectuează eluția prin dizolvarea unui volum intens de pH folosind un amestec de tamponare acid, 4 mM (4 mM fiecare acid aspartic -DL, acid L-glutamic, și glicerină, pH 2,3). Eluția se efectuează la o rată de curgere de 10ml/h și se colectează 10 ml de fracțiune; se urmăresc proteinele prin adsorbție de 280 nm; se testează fracțiunile pentru activitatea enzimatică și se determină pH-ul fiecărei fracțiuni. Fracțiunile conținând activitate enzimatică se colectează și se distilează contra apă și se concentrează într-un microconcentrator Amicon (30000 separate). Enzima se depozitează la 4°C.

Controlul enzimei

Activitatea oxalat decarboxilazică se determină, de asemenea, prin măsurarea eliberării de $^{14}\text{CO}_2$ de acid oxalic - (^{14}C) (Amersham 4,1 mCi/ml). Controlul enzimei se realizează în fiole mici de sticlă care au un conținut de 1 ml, din următorul amestec de reacție: citrat de potasiu 0,2 M, pH 3,0, oxalat de potasiu 0,005 M, pH 3,0, acid oxalic- (^{14}C) 5,6nM (0,0227 μCi) și 0,2 ml de soluție de enzimă. Eprubetele se preincubează 5 min. înaintea adăugării enzimei. Eprubetele se sigilează cu dopuri de cauciuc și se incubează la 37°C, timp de 30 min. într-o baie de apă agitată. Reacția se termină prin injectarea de 0,2 ml acid tricloracetic 50%v/v prin dopurile de cauciuc și eprubetele se agită pentru un timp suplimentar pentru captarea în întregime a $^{14}\text{CO}_2$ degajat în 0,3 ml hidroxid metilbenzetonil (Sigma) plasate într-un tub de plastic în interiorul eprubetei de sticlă. Tuburile de sticlă se retrag și conținutul se transferă la 5 ml de toluen pe baza fluidului de scintilare și se determină radioactivitatea într-un contoar de scintilare în lichid. Se montează eprubete martor în care se adaugă 0,2 ml de TCA 50% înaintea enzimei s-au enzima a fost omisă. Din cinetica experimentelor se corectează valorile pentru radioactivitatea obținută de la enzima denaturată termic.

Definiția unei unități:

O unitate se definește ca fiind cantitatea de enzimă care eliberează 1 μM de $^{14}\text{CO}_2$ per minut la 37°C, în condiții standard de control. Totalul eficienței controlului a fost de obicei între 60 și 70%. Proteina se determină prin metoda Lowry (Peterson, Anal. Biochem. 83:346 (1977)). V_{max} și K_m se determină prin Lineweave-Burk plot (Lineweaver & Burk. J-Am.Chem.Soc. 56:658-666 (1934)).

Determinarea masei moleculare

Masa moleculară a oxalat decarboxilazei se determină prin cromatografie de filtrare pe gel. Enzima purificată (100 μg în 100 μl) se încarcă pe o coloană FPLC în gel de permeație (Superoză 12:10 x 300 nm) la o rată de curgere de 0,5ml/minut folosind tampon de acetat de potasiu 0,02 M, KCl 0,1 M, pH 4,5 la temperatura camerei. Proteinele se detectează la 280 nm. Proteinele standard folosite sunt tiroglobulina (660 kDa, Pharmacia), ferritina (440 kDa, Pharmacia), catalaza (8230 kDa, Pharmacia), aldoza (158 kDa Pharmacia), alcool dehidrogenaza (150 kDa, Sigma), și anhidraza carbonică (29 kDa, Sigma). Compoziția subunității se determină prin electroforeză în placa de gel dodecilsulfat de sodiu poliacrilamidic în gradient de geluri 7%, folosind sistemul de tampon Laemmli (Laemmli, Nature 227:680 (1970)).

Criterii de puritate

Omogenitatea oxalat decarboxilazei unificate se determină prin separarea a 10 μg de proteină (maximul A) pe electroforeză în gel bidimensională conform O'Farrell, J.Biol.Chem. 250:4007 (1975)).

Compoziția aminoacidică

Se hidrolizează probele în HCl 6M din eprubetele sigilate evacuate la 110°C, timp de 22 h. Hidrolizatele se analizează cu un analizor de aminoacizi (LKB 4151 Alpha Plus). Cisteina și cistina se determină cu acid cistic după oxidare cu acid performic. Triptofanul nu se determină. Digestia cu protează se va face cum s-a descris mai devreme (Cleveland, Methods in Enzymol, 96/222(1983)9.

Analiza carbohidraților

Colorarea glicoproteinei se face folosind reactivul propionat-baze Schiff. Conținutul de zahăr natural se determină prin metoda fenol-acid sulfuri (McKelvy et al., Arch. Biochem. Biophys. 132:99 (1969)), cu glucoză drept standard. Enzima se deglicozilează prin Endo- β -N-acetilglucosaminidaza H de la S. Plicatus, (Boehringer Manneheim, 40 mU/ μ g) conform lui Trimble (Trimble et al., Anal. Biochem. 141:515(1984)).

Prepararea antiserului

Oxalat decarboxilaza (1 mg/ml) se denaturează termic prin fierbere timp de 10 min. în PBS în prezență de SDS 0,5%. Antigenul proteic (150 μ g) din PBS se emulsionează cu adjuvant Freund complet și se injectează subcutanat într-un iepure alb neozelandez. După o perioadă de trei săptămâni se vor da următoarele sustineri în adjuvanți Freund incomplet. Se dă a 4-a injecție intravenos. Titrul anticorpului se urmărește folosind tehnica imunodifuziei Ouchterlony (Garvey et al., (1977) Methods in Immunol, 3rd Ed., W.A.Benjamin Inc., N.Y.). Purificarea de afinitate a anticorpului se face conform lui Iwaki et al., Cell 57:71(1989).

Western blot-ul și imunodetectia

Proteinele se transferă la o membrană microcelulozică (Schleicher & Schuell) la un curent constant de 150 mA, timp de 3 h, la 15°C, conform procedurii lui Towbin et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350(1979)). Imunodetectia se face folosind diluție 1:5000 de anticorp anti-oxalat decarboxilaza și se detectează calea reacției fosfatazei alcaline (Amersham, Su perecreen immunoscreening system).

Rezultate

Activitatea maximală a oxalat decar-

boxilazei se obține după 2 sau 3 zile de la adăugarea acidului oxalic. Rezultatele unei proceduri tipice de purificare sunt date în tabelul 1. Enzima se separă în două maxime pe o coloană de focalizare cromatografică: maximul A se eluează la pH 3,3, și maximul B se eluează la pH 2,5 (fig. 1). Maximul A se purifică de 1670 de ori cu o recuperare de 2,0%, în timp ce maximul B se coeluează cu 2 contaminanți minori și se purifică de 614 ori cu 15% recuperare (tabelul 1). Acești contaminanți se îndepărtează după trecere printr-o coloană de cromatografie cu gel de filtrare Sepharoză 48, și această proteină se folosește pentru determinarea compoziției de aminoacizi. Datorită purității ridicate a maximului A această proteină se folosește pentru lucrul în continuare. Materialul din maximul A se eluează ca un maxim unic pe o coloană de cromatografie a proteinei în lichid rapid Superoza 12, și 10 μ g de proteină se dau un singur spot pe electroforeza bidimensională în gel (fig. 2B). Cele două diluții seriale făcute de două ori arată că cel puțin 45mg de proteină se pot detecta prin colorare Coomassie Blue (fig. 2A). Distanța migrată a activității enzimatică ($R_f=0,35$, fâșia de gel 4) se corelează cu cea a singurei benzi colorate pe PAGE nederaturat (fig.3). Nu se găsește nici o bandă proteică s-au activitate enzimatică în nici o altă parte a gelului. Astfel, banda proteică corespunzătoare maximului A are activitate oxalat decarboxilazică. Preparatele enzimatică sunt stabile la 4 sau -20°C, și mai mult de 70% din activitatea inițială poate fi măsurată după 4 luni de stocare la 4°C, la 1mg/ml în acetat de potasiu 0,02M (pH 4,5).

Tabelul 1

Tabelul purificării de la un experiment tipic

Etapă de purificare	Proteină totală	Activitate totală	Activitate specifică	Purificări x	Randament %
1. Extract brut	4480	950	0,21	1	100
2. Acetonă II	120	608	5,06	24	64
3. Acetonă V	3,8	260	68,8	328	27,3
4. Focalizare cromatografică					
a. Maxim A	0,08	28	350	1670	2,9
b. Maxim B	1,24	160	129	614	16,8

* se utilizează 150 g de pudră măcinată în azotat lichid.

Datele compoziției aminoacizilor ale celor maxime indică prezența unui conținut foarte ridicat de aminoacizi acizi (22%) (tabelul 2). Aceasta ar putea contribui la valorile scăzute ale *pH*, deși proporția amidării în proteina nativă nu s-a determinat. Cele două maxime au compoziții aminoacide foarte asemănătoare unui conținut în metionină și tirozină de 2 ori mai ridicat în maximul B și a unui conținut în acid cistic de 2 ori mai ridicat în maximul A. Înrudiri suplimentare sunt indicate prin configurația peptidică a celor două maxime folosind proteaza V8 de *Staphylococcus aureus* (fig. 4). Anticorpul purificat prin afinitate direcționat împotriva maximului A reacționează încrucișat cu proteina maximului B. Compoziția de aminoacizi, hărțile peptidice și reactivitatea imunologică încrucișată arată că cele două maxime rezolvate pe cromatofocalizare sunt înrudite unul cu altul. Cele două forme cu diferențe în *pH* pot fi datorate gradelor diferite de amidare sau aminoacizilor acizi, sau pot fi datorate microheterogenității din catenele oligozaharidice constituente.

Tabelul 2

Compoziția de aminoacizi

	Maxim A % ^a	Maxim B %
Asx	10,57	10,31
Glx	11,75	11,52
Lys	3,2	2,96
Arg	2,84	2,89
His	2,66	2,74
Gly	8,44	9,44
Ser	7,23	7,19
Thr	8,56	8,48
Cys ^c	0,66	0,28
Tyr	0,84	1,95
Ala	11,03	10,92
Val	6,31	6,52
Leu	7,79	7,19
Ile	4,00	3,86
Pro	8,64	8,46
Phe	5,13	4,68
Met	0,34	0,69
Trp	Nd ^b	ND
Amoniac	ND	ND

^a: moli %

^b: nu s-a determinat

^c: determinat ca acid cistic.

Masa moleculară a enzimei native estimată prin filtrare în gel a fost 560 kDa. Electroforeza pe gradient SDS-gel poli-acril-amică arată prezența unei singure polipeptide de 64kDa (fig. 2A). Această mărime moleculară este obținută constant cu toate procente diferite de gel folosite cu sistemul de tampon Laemmli. Când enzima se tratează cu endo- β -N-acetilglucosaminidaza N, mărimea benzii principale deglicozilate este 55kDa (fig. 5). Enzima se găsește a fi glicozilată și mărimea moleculară aparent ridicată obținută prin filtrarea în gel poate datorată tendinței anumitor glicoproteine de a interacționa necovalent în soluție (Farach-Carson et al., Biotechniques 7:482 (1989); Kleiman et al., Biochemistry 25:312 (1986)).

De la punctele Lineweaver-Burk se calculează un k_m aparent cu valoarea de 4,5 mM pentru oxalat de potasiu ca substrat. Aceasta dă un V_{max} de 166 μ mol/min/mg. Enzima este inhibată competitiv prin ioni fosfat și se obține un K_i de 9mM când se adăugă la reacție 90 mM PO_4^{2-} . Enzima este specifică pentru oxalat ca substrat deoarece acidul citric, acidul acetic, acidul oxalacetic, acidul succinic și acidul formic nu s-au folosit ca substrat.

Enzima nu este inactivată ireversibil pe un domeniu extins de valori ale pH-ului, pH-ul optim pentru decarboxilare fiind 3,0. Enzima și-a păstrat 78% din activitatea inițială după 20 de min. de incubare la 80°C. Inactivarea aproape totală se observă la 96°C în 10 min. de incubare. Activitatea enzimatică nu este afectată prin reactivi cu grupare sulfhidril, enzima menținând 95% din activitatea sa în prezența a 50 mM acid *p*-clormercurbenzensulfonic sau 50 mM iodacetat. Oxalat decarboxilaza și-a păstrat 45% din activitatea sa după incubare cu SDS 10% timp de 30 min. la temperatura camerei. Totuși, când se încălzește la 60% în prezență de SDS 10% aproape întreaga sa activitate se pierde. Natura glicoproteinei este indicată prin colorație pozitivă cu reactivul periodat-bază Schiff; el se leagă la concavali A-Sepharoză și se eluează cu α -metilmonozidă. Conținutul

zahărului neutru se estimează a fi 15% prin metoda fenol/acid sulfuric.

Imunotitrarea enzimei cu 8 μ l de antiser brut anti-oxalat decarboxilaza reduce la mai puțin de 60% din activitatea inițială în supernatant (fig. 6). Antiserul contra oxalat decarboxilaza folosit la o diluție 1:5000 poate detecta un minim de 1,0 ng a proteinei maximului A. Antiserul reacționează încrucișat cu toate peptidele obținute de la o digestie V8 proteazică (fig. 4) și cu formele deglicozilate ale maximelor A ale enzimelor. Antiserul purificat prin afinitate contra maximului A reacționează încrucișat cu maximul B al oxalat decarboxilazei și oxalil-CoA decarboxilaza de la *Oxalobacter formigenes* tulpina OxB. Ea nu reacționează încrucișat cu oxalat decarboxilaza de la *Hordeum vulgare* (orz).

Exemplul 2 - Clonarea moleculară și expresia ADN-ului care codifică oxalat decarboxilaza

Protocol experimental

Clonare moleculară

Se extrage ADN-ul total de la pudra măcinată în azot lichid de *C. velutipes* conform metodei lui Chomzynski și Sacchi (Anal. Biochem. 162:156 (1987)) și se selectează ARN poli(A+) prin două cicluri de cromatografie pe celuloză oligo(dT). Sinteza cADN, clonarea și imunoccreening-ul băncii se realizează urmând instrucțiunile de la Amersham. Se sintetizează cADN-ul din mARN dintr-o cultură de 12 h indusă oxalat prin inițiere oligo(dt) a 5 μ g de ARN poli (A+) și se clonează într-un sit restricție *EcoRI* al lui *Agtl*. Fagii s-au crescut în gazda *E. Coli* Y1090 r⁻ pentru imunocreening.

Anticorpul antioxalat decarboxilaza se vor preadsorbi cu 1mg/ml lizat celular *E. Coli* Y1090 pentru îndepărtarea ractivității și se va folosi pentru imunocreening. Pentru detectarea clonelor pozitive, se folosesc conjugat alcalin fosfatază IgG capră anti-iepure. ADN-ul se prepară de la fagii imunopozitivi conform lui Del Sal (Biotechniques 7:514 (1989)) și se determină mărimea insertului lor. Fuziunea proteinelor se caracterizează conform la (Anal. Biochem. 156:354 (1986)); înrudirea inserturilor se studiază

folosind ca sondă unul dintre inserți. Insertul 1,2 kb de la clona nr. se subclonează în pTZ18U (USB) și se folosește ca sondă pentru alte experimente.

Hibridizarea diferențială

Hibridizarea diferențială a clonelor imunopozitive se studiază prin prepararea de sonde cADN cu împletire simplă sintetizată de la mADN-ul izolat din miceliu la 0 h și la 12 h de inducție prin oxalat. Fagul ADN recombinat (0,5 μg) se leagă la membrană Gene Screen Plus în duplicat Hybrid-slot™ Filtration, în mod diversificat conform instrucțiunilor din manualul Gene Screen Plus și se hibridizează la sonde cADN induse și neinduse oxalat. Activitatea specifică a sondei este 2×10^8 cpm/μg cADN.

Hibridizare

Hibridizarea ADN-ului și ARN-ului se face la 42°C folosind procedura formamidă din manualul Gene Screen Plus. Se face peste noapte o prehibridizare în formamidă deionizată 50%, SDS 1%, clorură de sodiu 1M și dextran sulfat 10%. Petele se hibridizează la sonda denaturată ($1-4 \times 10^5$ dpm/ml) la 42°C timp de 24 h. Membranele se spală succesiv în două spălări fiecare de $2 \times$ SSC la temperatura camerei $2 \times$ SSC plus SDS 1% la 65°C timp de 30 min. și $0,1 \times$ SSC la temperatura camerei timp de 30 min. Membranele umezite înfășurate în plastic sunt expuse la filme Kodac XAR în prezența ecranului de intensificare.

Prepararea sondei

ADN-ul subclonat în pTZ18U se digeră cu EcoRI și se separă pe gel de agaroză cu punct de topire scăzut 2%, insertul ADN s-a incizat și se marchează cu (α - 32 P) dATP prin metoda de marcarea cu primer oarecare al lui Feinberg și Vogelstein (Anal. Biochem. 137:226 (1984)).

Izolarea ADN-ului genomic și analiza Southern

Se izolează ADN genomic de la *C. velutipes* liofilizat prin metoda lui Zolan și Pukkila (Mol. Cell. Biol. 6:125 (1986)). ADN-ul se stratifică de 2 ori pe gradient CeCl pentru a obține ADN-ul care poate să fie

digerat cu enzima de restricție. Se digeră 4 μg ADN genomic cu diferite endonucleaze de restricție și se separă pe gel de agaroză 1,2%. Se transferă ADN-ul la membrană Gene Screen Plus prin procedura de pătare alcalină (Reed & Mann, Nucleic Acids Resc 13:7207 (1985)).

Translatarea in vitro

ARN poli(A+) se translatează folosind un reticulocitar de iepure, conform instrucțiunilor fabricantului (Promega). Proteinele translate se precipită prin antiseruri specifice și se analizează prin electroforeză SDS-gel poliacrilamidic.

Selecție hibridă

Selecția hibridă a mARN de oxalat decarboxilaza se realizează prin hibridizarea ARN poli(A+) (20 μg în 200 μl formamidă 65% Pipes 10 mM, pH 6,4, NaCl 0,4 M, EDTA 8 mM, SDS 0,5%, 100 μg/ml tARN de drojdie) la 50°C, timp de 4 h, la membrana Gene Screen Plus pe care s-a legat cADN denaturat (4 μg). Filtrele se prepară conform manualului Gene Screen Plus și a hibridizare, spălare și eluția ARN-ului hibridizat se realizează conform (Jagus, Methods in Enzimol. 152:567 (1987); Parnes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2263 (1981)). Se extrage ARN-ul eluat cu fenol:cloroform (1:1), se precipită în etalon, se reconstituie direct *in vitro* amestecul translatat și se imunoprecipitează conform lui Anderson și Blobel (Methods in Enzymology 96:111 (1983)).

Analiza Northern blot

Se denaturează 1 μg ARN poli(A+) sau 10 μg ARN total cu glioxal și se separă pe geluri de agaroză 1,3% conform lui Sambrook (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) și se pătează prin capilaritate pe o membrană Gene Screen Plus după instrucțiunile din manualul Gene Screen Plus. Filtrele se sondează cu insertul cADN 1,2 kb 32 P-marcant.

Rezultate

Așa cum s-a notat mai sus, se construiește o bancă de expresie cADN de la mARN indus oxalat la 12-h în λ gtlI.

Se cercetează aproximativ 47000 recombinanți cu anticorpus preparat cu lizat *E. Coli*. Se obține 15 plăci imunopozitive și se purifică, 12 dintre aceștia se hibridizează încrucișat. Aceștia codifică fuziuni de proteine comparabile mărimilor insertului (fig. 7A). Fagul ADN de la 15 clone se imobilizează în duplicat pe o membrană Gene Screen Plus și se sondează cu sonde cADN neinduse oxalat. Hibridizarea diferențială a celor 15 clone imunopozitive arată că 12 au hibridizat la sonda cARN și nu au dat nici un semnal cu oxalat minus mARN (fig. 7B.). Astfel, expresia a 12 clone se induce prin oxalat.

Subclona pTZ18U a insertului 1,2 kb de la clona 3 a λ se folosește pentru a hibridiza selectiv mARN-ul. Translatarea *in vitro* a ARN-ului selectat hibrid și imunoprecipitarea produsului translatat dă o bandă de 55 kDa (Fig. 8B, traseul 2) care este similară mărimii obținută cu mARN poli(A+) total (traseul 3) și corespunde mărimii proteinei deglicozilate. Această proteină de 55 kDa nu se obține când este omis mARN-ul (fig. 8B) (traseul 1) sau cu secvențele vectorului nerecombinat (traseul 4) și nu cu mARN 0-h neindus (traseul 1), banda de 55 kDa se prezintă a fi înrudită cu oxalat decarboxilaza ca oxalat decarboxilază purificată concurând pentru situsurile de legare antigenice, și produce o descreștere în intensitatea benzii de 55 kDa (traseul 3) din translarea *in vitro* și experimentele de imunoprecipitare. Petele Southern genomice care folosesc ca sondă insertul 1,2 kb arată prezența de benzi unice cu BamHI, HindIII, PvuII, SspI, XbaI și XhoI, indicând prezența unei singure copii a genei (fig. 9B). Cele două benzi ale intensităților inegale obținute cu KpnI și PstI se

datorează prezenței situsurilor interne (sit unic pentru fiecare enzimă) în insertul cADN de 1,2 kb pentru aceste enzime. Sonda 1,2 kb hibridizează la o singură specie de mARN de 1,5 kb de la ARN poli(A+) 12-h indus oxalat și nu hibridizează la ARN-ul de la traseul neindus (fig. 9A).

Se colectează în aceeași serie de culturi probe de la stadii diferite după inducție și se analizează pentru nivelurile ARN, activitatea enzimatică și proteina totală. Northern blot-ul ARN-ului total arată că banda 1,5 kb este absentă la 0-h și se maximizează la 12-h. La trei zile după inducție nu se detectează nici un ARN (fig. 10B.) Activitatea enzimatică se detectează la 12-h după adăugare de oxalat și la maximum activității se observă în 2 zile după care există un declin constant. Nu se observă o creștere sau descreștere în proteina totală (fig. 10C). De aici, se observă o relație temporală între apariția activității enzimatice și nivelurile mARN, deoarece nivelurile mARN ating maximum la 12-h după inducție și activitatea enzimatică maximă se obține la 48 h după adăugarea acidului oxalic.

Toate referințele citate aici sunt încorporate prin referire.

Exemplul 3. Clonarea oxalat decarboxilazei

Pentru atașarea ADN-ului care codifică o peptidă de tranzit la gena oxalat decarboxilaza a pOXD1, se folosește PCR. Peptida de tranzit aleasă este cea de la gena extinsă de la *Nicotina plumbaginifolia*. Întreaga peptidă de tranzit plus doi aminoacizi ai proteinei extensină matură ce fuzionează în amonte ATG-ului decarboxilazei. 5'-ul oligonucleotidei PCR a fost EXTOD-5:

5'-GAAGACGATAGGATCCATTTGTTTCAAAG*ATG GGA AAA ATG
BamHI *Met Gly Lys Met

—ADN care nu codifică—

GCT TCT CTA TTT GCC ACA TTT TTA GTG GTT TTA GTG TCA
Ala Ser Leu Phe Ala Thr Phe Leu Val Val Leu Val Ser
CTT AGC TTA GCT /TCT GAA (ATG TCC AAC ACC TCC CAA)
Leu Ser Leu Ala Ser Glu (Met Phe Trp Trp Phe Gln)

(-) Suprapunerea cu stratul genei oxalat decarboxilaza

* Startul translațional la începutul peptidei de tranzit

/ Prelucrarea sitului în produsul de translație

3'-ul nucleotidei PCR a fost EXTOD-3, desemnat împotriva secvenței la poziția 210-190 pe secvența pOXD1 originală (aval-ul sitului KpnI):

5'-TGGGTCAGTGGTCTCATT-3'

Folosind primerii de mai sus într-o reacție PCR cu plasmidul ADN pOXD1 ca matrice se obțin numai pete.

Pentru îmbogățire în vederea obținerii produselor de lungime integrală, acest produs primar se reamplifică folosind aceleași 3', dar un primer 5' nou, EXTOXR-6

(5'-GAAGACGATAGGATCCATTTG-3') care reprezintă îndepărtarea secvenței 5' a lui EXTOD-5 de mai sus.

Urmărind o a doua rundă a PCR, se vizualizează o bandă de mărime așteptată (aproximativ 290bp). Aceasta se purifică, se digeră cu BamHI-KpnI și se clonează în pOXD1 din care fragmentul rezident BamHI-KpnI(125 bp), fusese îndepărtat. Se secvențializează un total de 17 clone care conțin fragmentul mai mare de-a lungul insertului.

Se confirmă o clonă care conține secvența corectă în insertul BamHI-KpnI. Gena oxalat decarboxilaza/peptidă de tranzit se îndepărtează din această clonă ca un fragment BamHI-EcoRI, care s-a teșit cu Klenow și se inserează în situl SmaI al lui pJRIRi.

Se identifică recombinatii prin hibridizare și sa confirmat/orientat cu digesturi de diagnostic (HinfIII-EcoRI, KpnI, HindIII și PstI). O clonă care conține caseta OX-D în aceeași orientare ca și caseta nptII s-a numit: caseta pSR21 = OX-D insertată în situl SmaI.

Exemplul 4. Transformarea tutunului folosind vectorii descriși mai sus

(a) Transferul vectorilor la *Agrobacterium*

Construcțiile se introduc în *A. Tumefaciens* LBA4404 prin transformare directă urmând procedurile publicate.

Prezența și integritatea construcțiilor se verifică prin digestie de restricție și experimente blod pentru a verifica că nu se întâlnește nici o recombinare în timpul transferului vectorilor la *Agrobacterium*.

(b) Transferarea discului de frunză de tutun

Se transformă discuri de frunze de tutun (*N. Tabacum*, varietate Samsun) folosind proceduri bine stabilite publicate anterior. Plante conținând construcția se identifică prin PCR și se selectează pentru analiza ulterioară.

Exemplul 5. Determinarea activității oxalat decarboxilazice în plante transgenice

Activitatea enzimei se determină prin măsurarea celor două produse de degradare ale oxalat decarboxilazei (dioxid de carbon și format). Eliberarea de $^{14}\text{CO}_2$ de la acid organic ^{14}C se măsoară după cum urmează (Mehta și Datta, 1991). Se preincubează fiole de sticlă care conțin un amestec de reacție (vezi mai jos) timp de 5 min. Înaintea adăugării de extras/enzimă. Fiolele se sigilează și se incubează la 37°C timp de 30 min. într-o baie cu apă agitată. Reacția se oprește prin injectarea a 0,2 ml de acid tricloacetic 50%(v/v) prin dop. Fiolele se agită în hidroxid de metilbenzetonil (0,2 ml) conținut într-o filă de plastic în interiorul unei eprubete de sticlă. Fiolele se golesc și conținutul se transferă la fluidul de scintilație și s-a determinat radioactivitatea printr-un contoar de scintilație în lichid.

Amestec de reacție

Azotat de potasiu pH 3,0,2 M

Oxalat de potasiu pH 3,0,005 M

Acid oxalic- ^{14}C 5,6nM (0,0227 μCi)

Producția de format se măsoară prin metoda lui Magro et al., (1988) adaptată pentru proprietățile biochimice diferite ale oxalat decarboxilazei izolate de la *Collybia velutipes* mai degrabă decât de la *Sclerotinia*. Se folosește o metodă în două etape. Inițial, se pregătește amestecuri de reacție conținând 20 μl de acid oxalic 40 μM (pH corectat cu hidroxid de potasiu la pH 3,5), o-fenilendiamină 15 mM și albumină serică bovină 0,1mM într-un tampon citrat (0,2M). Se dăugă extracul/enzimă (volumul final 0,5 ml) și reacțiile se incubează la 25°C, timp de 20 min. Decarboxilarea se oprește prin adăugare de K_2HPO_4 (pentru a da un pH final 7,5). Se adaugă și se amestecă o jumătate

volum de sare nicotinamidă adeninucleotidlitu (NAD) 45 mM. După trei minute se adăugă 15 µl de format dehidrogenaza (FDH, 80 U/ml). Concentrația formatului produs se estimează apoi prin măsurarea creșterii în absorbantă la 340nm a amestecurilor de reacție înainte și după 20 min. după adăugarea de FDH. Se realizează controale fără acid oxalic pentru fiecare extract și activitatea ulterioară se calculează pe baza proteinei.

Exemplul 6. *Oligonucleotide pentru PCR și analiza southern*

Pentru diagnosticele PCR în vederea confirmării prezenței genei oxalat decarboxilază în vlăstarii regenerați se alege oligoDEC1 de la secvența genei. În combinație cu oligonucleotida 35S (43) aceasta dă o bandă PCR de diagnostic de circa 289bp. Aceste oligonucleotide se folosește pentru confirmarea stării transgenice vlăstarelor înrădăcinate. Pentru a genera o sondă oxalat decarboxilază 5' se folosește încă două secvențe oligonucleotidice DEC2 și DEC 3, un fragment de aproximativ 450 bp pentru utilizare în analiza Southern a plantelor transgenice generate și a urmașilor lor.

Oligonucleotida DEC1-5' în secvența care codifică oxalat decarboxilaza pentru utilizare cu promotor oligo în diagnostice PCR.

5'-GAG AAG GAT GAC AGT GAG CAG ACG TTG-3'

Oligonucleotidele DEC2 și DEC3 -

Mid și 3' din regiunea care codifică oxalat decarboxilaza se folosește combinate pentru a genera sonde pentru analize Southern:

DEC2

5'-CCA TGA CGA CGG TAC ATT CTT GCT CAC-3'

DEC3

5'-TGA AGG AAC ATA AGC GAT ATC ACC ACC-3'

Revendicări

1. ADN, **caracterizat prin aceea că**, codifică oxalat decarboxilaza, care are secvența de nucleotide prezentată în fig. 11, precum și variante ale acesteia obținute prin degenerarea codului genetic.

2. ADN, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, se utilizează pentru protecția plantelor la atacul acidului oxalic, prin aplicarea oxalat decarboxilazei în combinație cu un purtător adecvat, acceptat în agricultură.

3. ADN, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, se utilizează pentru protecția plantelor la atacul acidului oxalic, prin încorporarea în genomul plantei, prin transformare, a ADN-ului ce codifică oxalat decarboxilaza, precum și a regiunilor de inițiere și de terminare care reglează exprimarea acestuia, obținându-se astfel, o celulă de plantă transformată, precum și o plantă recombinată.

Președintele comisiei de examinare: **ing. Barbu Mara**

Examinator: **ing. Eremia Laura**

