

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

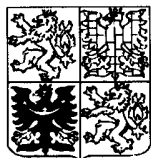
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2727-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27. 02. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.02.96,**
28.02.96, 21.06.96

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/012705, 96/013612,**
96/020003

(33) Země priority: **US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 11. 98**
(Věstník č. 11/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/03343**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/32028**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/82
C 12 N 9/02
C 12 N 15/53

(71) Přihlášovatel:

NOVARTIS AG, Basle, CH;

(72) Původce:

Johnson Marie A., Raleigh, NC, US;
Volrath Sandra L., Durham, NC, US;
Ward Eric R., Durham, NC, US;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Promotory rostlinných protoporfyrinoge-
noxidázových genů

(57) Anotace:

Sekvence kódující promotory přirozeně se vyskytující ve spojení s kódujícími sekvencemi rostlinné protoporfyrinogenoxidázy /protox/ a jejich deriváty. Promotory se mohou užít k řízení exprese operativně spojené heterologní kódující sekvence v rostlinné buňce. Tyto promotory jsou zvláště vhodné pro expresi modifikovaných forem cílových proteinů herbicidu, zvláště pak modifikované formy protox, čímž se dosáhne tolerance k herbicidu, který inhibuje odpovídající nemodifikované enzymy. Rekombinantní molekuly DNA a chimérické geny obsahující takové promotory, a také rostlinné pletivo a rostliny obsahující chimérické geny.

CZ 2727-98 A3

Promotory rostlinných protoporfyrinogenoxidázových genů

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových sekvencí DNA, které působí jako promotory transkripce spojených sekvencí v rostlinách. Specificky se vynález týká nových promotorů, které jsou přirozeně spojeny se sekvencemi kódujícími rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu (protox).

Současný stav techniky

I. Enzym protoporfyrinogenoxidáza (protox) a jeho účast v biosyntéze chlorofylu/hemu

Biosyntetické cesty vedoucí k tvorbě chlorofylu a hemu sdílejí řadu společných kroků. Chlorofyl je světlosběrný pigment přítomný ve všech zelených fotosyntetických organismech. Hem je kofaktor hemoglobinu, cytochromů, oxygenáz P450 se smíšenou funkcí, peroxidáz a kataláz (viz např. Lehninger, Biochemistry, Worth Publishers, New York, 1975), a je proto nepostradatelnou složkou všech aerobních organismů.

Poslední společný krok v biosyntéze chlorofylu a hemu je oxidace protoporfyrinogenu IX na protoporfyrin IX. Protoporfyrinogenoxidáza (nadále označovaná jako „protox“) je enzym, který katalyzuje tento poslední krok (Matringe et al., Biochem J. 260: 231, 1989).

Enzym protoporfyrinogenoxidáza byl purifikován, buďto částečně nebo úplně, z mnoha různých organismů včetně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (Labbe-Bois a Labbe, Biosynthesis of Heme and Chlorophyll, E. H. Dailey, ed.,

McGraw Hill, New York, s. 235-285, 1990), etioplastů ječmene (Jacobs a Jacobs, Biochem J. 244: 219, 1987) a myších jater (Dailey a Karr, Biochem. 26: 2697, 1987). Geny kódující protox byly izolovány ze dvou prokaryotických organismů, a sice *Escherichia coli* (Sasarman et al., Can. J. Microbiol. 39: 1155, 1993) a *Bacillus subtilis* (Dailey et al., J. Biol. Chem. 269: 813, 1994). Tyto geny nemají žádnou podobnost v sekvencích a ani proteinové produkty predikované na jejich základě nesdílejí žádnou identickou sekvenci aminokyselin. Protein z *E. Coli* je velký asi 21 kDa a je asociován s buněčnou membránou. Protein z *B. subtilis* je velký asi 51 kDa, je rozpustný a aktivní je v cytoplazmě.

cDNA kódující lidskou protox byla v nedávné době izolována (Nishimura et al., J. Biol. Chem. 270(14): 8076-8080, 1995) a také byla izolována rostlinná cDNA (Mezinárodní patentová přihláška PCT/IB95/00452, podaná 8. června 1995, publikovaná 21. prosince 1995 jako WO 95/34659).

II. Gen protox jako cíl herbicidů

Použití herbicidů k omezení nežádoucí vegetace jako jsou plevely nebo jiné nežádoucí rostliny v plodinách se stalo univerzální praxí. Odpovídající trh představuje ročně více než miliardu dolarů. I přes toto extenzivní využívání, kontrola plevelů představuje pro zemědělce významný a často finančně náročný problém.

Efektivní využití herbicidů vyžaduje dobrý management. Např. vhodná doba a způsob aplikace, a také vývojové stadium plevelu, jsou kritické faktory pro účinnou kontrolu plevelu užitím herbicidů. Vzhledem k tomu, že některé plevely jsou rezistentní k herbicidům, výroba účinných herbicidů je stále důležitější.

Naneštěstí herbicidy, které mají největší potenciál, širší druhové spektrum a rychlejší degradaci v půdě, mohou být také nejvíce fytotoxické pro plodiny. Jedno řešení tohoto problému bylo vyvinutí plodin rezistentních nebo tolerantních k herbicidům. Hybridi nebo variety plodin rezistentní k herbicidům umožňují použití herbicidů bez rizika poškození plodiny. Vývoj rezistence umožňuje také použití herbicidů i tam, kde to dříve nebylo možné nebo to bylo možné jen omezeně (např. použití před vzcházením) vzhledem k citlivosti plodiny k herbicidu. Např. U.S. patent č. 4 761 373 Andersona et al. popisuje rostliny rezistentní k různým imidazolinonovým nebo sulfonamidovým herbicidům. Rezistence je způsobena změněným enzymem syntázou acetohydroxykyseliny (AHAS). U.S. patent č. 4 975 374 Goodmana et al. se týká rostlinných buněk a rostlin obsahujících gen kódující mutovanou glutaminsyntetázu (GS) rezistentní k inhibici herbicidy, které jsou známy tím, že inhibují GS, jako je např. fosfinotricin nebo methioninsulfoximin. U.S. patent č. 5 013 659 Bedbrooka et al. se týká rostlin, které exprimují mutovanou acetolaktátsyntázu, která udílí rostlinám rezistenci k inhibici sulfonylmočovinovými herbicidy. U.S. patent č. 5 162 602 Somerse et al. popisuje rostliny tolerantní k inhibici herbicidy založenými na cyklohexandionu a kyselině aryloxyfenoxypyropanové. Tolerance je udílěna změněnou acetylkoenzym-A-karboxylázou (ACCase).

Enzym protox slouží jako cíl mnoha různých herbicidních sloučenin. Herbicidy, které inhibují protox, zahrnují molekuly mnoha různých strukturních tříd (Duke et al., Weed Sci. 39: 465, 1991, Nandihalli et al., Pesticide Biochem. Physiol. 43: 193, 1992, Matringe et al., FEBS Lett. 245: 35, 1989, Yanase a Andoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35: 70, 1989). Tyto herbicidní sloučeniny zahrnují difenylétery

(např. acifluorfen, 5-[2-chloro-4-(trifluorometyl)fenoxy]-2-nitrobenzoová kyselina a její metylester, oxyfluorfen, 2-chloro-1-(3-etoxy-4-nitrofenoxy)-4-(trifluorobenzen)), oxidiazoly (např. Oxidiazon, 3-[2,4-dichloro-5-(1-metyloxy)fenyl]-5-(1,1-dimetyletyl)-1,3,4-oxadiazol-2-(3H)-on), cyklické imidy (např. S-23142, N-(4-chloro-2-fluoro-5-propargyloxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydroftalimid, chloroftalim, N-(4-chlorofenyl)-3,4,5,6-tetrahydroftalimid), fenylpyrazoly (např. TNPP-etyl, etyl-2-[1-(2,3,4-trichlorfenyl)-4-nitropirazolyl-5-oxy]propionát, M&B 39279), pyridinové deriváty (např. LS 82-556), fenopylát a jeho O-fenylpyrrolidinové a piperidinokarbamátové analogy. Mnohé z těchto sloučenin kompetitivně inhibují normální reakci katalyzovanou enzymem, působí tedy zjevně jako analogy substrátu.

Inhibiční vliv na protox se typicky určuje měřením fluorescence v oblasti 622 až 635 nm, po excitaci v pásmu 395 až 410 nm (Jacobs a Jacobs, Enzyme 28: 206, 1982, Sherman et al., Plant Physiol. 97: 280, 1991). Tento test je založen na skutečnosti, že protoporfyrin IX je fluorescenční pigment, zatímco protoporfyrinogen IX není.

Předpokládaný způsob působení herbicidů inhibujících protox zahrnuje akumulaci protoporfyrinogenu IX v chloroplastu. Předpokládá se, že tato akumulace vede k pronikání protoporfyrinogenu IX do cytosolu, kde je oxidován peroxidázovou aktivitou na protoporfyrin IX. Pokud je vystaven světlu, protoporfyrin IX může způsobovat tvorbu singletního kyslíku v cytosolu. Singletní kyslík může zase vést k tvorbě dalších reaktivních molekul kyslíku, což může způsobovat peroxidaci lipidů a popraskání membrán, vedoucí až k rychlé buněčné smrti (Lee et al., Plant Physiol. 102: 881, 1993).

Všechny enzymy protox nejsou citlivé k herbicidům, které inhibují rostliný enzym protox. Jak protox kódovaná geny izolovanými z *Escherichia coli* (Sasarman et al., Can. J. Microbiol. 39: 1155, 1993) tak i z *Bacillus subtilis* (Dailey et al., J. Biol. Chem. 269: 813, 1994) jsou rezistentní k těmto herbicidovým inhibitorům. Kromě toho byly popsány mutanty jednobuněčné řasy *Chlamydomonas reinhardtii* rezistentní k fenylimidovému herbicidu S-23142 (Kataoka et al., Pesticide Sci. 15: 449, 1990, Shibata et al., In: Research in Photosynthesis, Vol. III, Murata, N., ed., Kluwer, Netherlands, s. 567-570, 1992). Přinejmenším jedna z těchto mutant má zřejmě změněnou aktivitu protox, která je rezistentní nejen k herbicidovým inhibitorům, na kterých byly mutanty selektovány, ale také k jiným třídám inhibitorů protox (Oshio et al., Z. Naturforsch. 48c: 339, 1993, Sato et al., In: ACS Symposium on Porphyrin Pesticides, Duke, S., ed., ACS Press, Washington, D.C., 1994). Byla popsána také mutovaná buněčná linie tabáku, která je rezistentní k inhibitoru S-21432 (Che et al., Z. Naturforsch. 48c: 350, 1993). Kromě toho v Mezinárodní patentové přihlášce PCT/IB95/00452 (podané 8. června 1995, publikované 21. prosince 1995 jako WO 95/34659) byly popsány sekvence kódující modifikované, k inhibitoru rezistentní formy rostliné protox.

III. Regulace exprese genu protox

Většina výzkumu, týkajícího se genu protox, který byl dosud prováděn, se soustředila na kódující sekvence a modifikace enzymu, které mohou poskytnout rezistenci k inhibitorům protox. V oboru dosud nejsou dostupné žádné informace týkající se regulačních prvků, které řídí a spouštějí expresi kódujících sekvencí protox v rostlinách.

25.08.98

- 6 -

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je založen na objevu, že promotorové oblasti přirozeně spojené se sekvencemi kódujícími rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu (protox), zde všeobecně označované jako „protox promotory“, jsou užitečné pro řízení exprese heterologní kódující sekvence v rostlině.

Předkládaný vynález poskytuje, v souladu s objevem, že promotorové oblasti přirozeně spojené se sekvencemi kódujícími rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu (protox) jsou užitečné pro řízení exprese heterologní kódující sekvence v rostlině, izolovanou molekulu DNA obsahující rostlinný protox promotor nebo jeho funkční ekvivalent. Předkládaný vynález dále poskytuje chimérický gen obsahující rostlinný protox promotor operativně spojený s heterologní kódující sekvencí. Vynález také poskytuje rostlinné pletivo a rostliny obsahující takový chimérický gen.

Podle jednoho aspektu vynálezu je protox promotor užit pro expresi k herbicidu rezistentních forem cílových proteinů herbicidu v rostlině, což uděluje rostlině rezistenci k herbicidu. Podle tohoto aspektu vynálezu může být protox promotor operativně spojen s kódující sekvencí rostlinného protox proteinu rezistentního k herbicidu, který je rezistentní k inhibitorům nemodifikovaného rostlinného protox proteinu.

Uložení

Vektorové molekuly uvedené v následujícím seznamu byly uloženy ve Sbírce patentovaných kultur (Patent Culture Collection, NRRL), Agricultural Research Service, Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, U.S.A., a to k uvedenému datu.

25.03.96

- 7 -

AraPT1Pro obsahující Protox-1 promotor z *Arabidopsis* byl uložen 15. prosince 1995 jako pWDC-11 (NRRL č. B-21515).

Plazmid obsahující promotor Protox-1 z kukuřice spojený se zbytkem kukuřičné protox-1 kódující sekvence byl uložen 19. března 1996 jako pWDC-14 (NRRL č. B-21546).

Plazmid obsahující Protox-1 promotor z cukrové řepy byl uložen 6. prosince 1996 jako pWDC-20 (NRRL č. B-21650).

Přehled sekvencí uvedených v oddíle „Seznam sekvencí“

Sekvence identifikačního čísla (dále jen i. č.) 1:
Sekvence DNA kódující protein protox-1 z *Arabidopsis thaliana*.

Sekvence i. č. 2: Aminokyselinová sekvence protox-1 z *Arabidopsis* kódovaná sekvencí i. č. 1.

Sekvence i. č. 3: Sekvence DNA kódující protein protox-2 z *Arabidopsis thaliana*.

Sekvence i. č. 4: Aminokyselinová sekvence protox-2 z *Arabidopsis* kódovaná sekvencí i. č. 3.

Sekvence i. č. 5: Sekvence DNA kódující protein protox-1 z kukuřice.

Sekvence i. č. 6: Aminokyselinová sekvence protox-1 z kukuřice kódovaná sekvencí i. č. 5.

Sekvence i. č. 7: Sekvence DNA kódující protein protox-2 z kukuřice.

Sekvence i. č. 8: Aminokyselinová sekvence protox-2 z kukuřice kódovaná sekvencí i. č. 7.

Sekvence i. č. 9: Sekvence DNA kódující protein protox-1 z pšenice.

Sekvence i. č. 10: Aminokyselinová sekvence protox-1 z pšenice kódovaná sekvencí i. č. 9.

Sekvence i. č. 11: Sekvence DNA kódující protein protox-1 ze soji.

25.08.98

- 8 -

- Sekvence i. č. 12: Aminokyselinová sekvence protox-1 ze soji kódovaná sekvencí i. č. 11.
- Sekvence i. č. 13: Sekvence promotoru genu protox-1 z *Arabidopsis thaliana*.
- Sekvence i. č. 14: Sekvence . promotoru genu protox-1 z kukuřice.
- Sekvence i. č. 15: Sekvence DNA kódující protein protox-1 z bavlníku.
- Sekvence i. č. 16: Aminokyselinová sekvence protox-1 z bavlníku kódovaná sekvencí i. č. 15.
- Sekvence i. č. 17: Sekvence DNA kódující protein protox-1 z řepy cukrovky.
- Sekvence i. č. 18: Aminokyselinová sekvence protox-1 z řepy cukrovky kódovaná sekvencí i. č. 17.
- Sekvence i. č. 19: Sekvence DNA kódující protein protox-1 z řepky olejky.
- Sekvence i. č. 20: Aminokyselinová sekvence protox-1 z řepky olejky kódovaná sekvencí i. č. 19.
- Sekvence i. č. 21: Sekvence DNA kódující protein protox-1 z rýže.
- Sekvence i. č. 22: Aminokyselinová sekvence protox-1 z rýže kódovaná sekvencí i. č. 21.
- Sekvence i. č. 23: Sekvence DNA kódující protein protox-1 z čiroku.
- Sekvence i. č. 24: Aminokyselinová sekvence protox-1 z čiroku kódovaná sekvencí i. č. 23.
- Sekvence i. č. 25: Sekvence intronu genu protox-1 z kukuřice.
- Sekvence i. č. 26: Sekvence promotoru genu protox-1 z řepy cukrovky.

Definice

Termín „rostlinný protox promotor“ se zde užívá k označení regulačního úseku, který se přirozeně vyskytuje proti směru transkripce („upstream“) od kódující sekvence protoporfyrinogenoxidázy (protox) v rostlině a je zodpovědný, ve svém přirozeném stavu, za regulaci transkripce příslušných protox kódujících sekvencí. Rostlinný protox promotor obsahuje úsek DNA přímo se účastnící vazby RNA polymerázy při iniciaci transkripce a další regulační *cis* prvky ležící proti směru transkripce, které ovlivňují transkripci operativně spojené kódující sekvence.

Termín „gen“ označuje molekulu DNA, která obsahuje 1) kódující sekvenci a 2) spojené regulační úseky, které spouštějí a regulují transkripci kódující sekvence ve vhodné hostitelské buňce. Kódující sekvence může kódovat užitečný transkript (např. protisměrnou „antisense“ RNA) nebo polypeptid vznikající translací kódovaného transkriptu. Gen obsahuje přinejmenším, ve směru 5'-3', promotorový úsek, kódující sekvenci a terminátor transkripce. Gen může obsahovat další regulační úseky, které mohou být buď částí minimálního prvku (např. vedoucí sekvence nebo signální peptidy v rámci kódující sekvence) nebo samostatné prvky (např. introny).

Termín „chimérický gen“ označuje gen, který se nevyskytuje přirozeně a jehož alespoň jedna složka je heterologní vzhledem k ostatním složkám. V popisu předkládaného vynálezu je „chimérický gen“ takový gen, který obsahuje promotor podle vynálezu operativně spojený s heterologní kódující sekvencí.

K označení vztahu mezi promotorem a kódující sekvencí se zde užívá termín „heterologní“, který tak označuje vztah, který se nevyskytuje přirozeně. Např. kódující sekvence je

považována za heterologní vzhledem k promotorové sekvenci, pokud je odlišná od kódující sekvence, která se přirozeně vyskytuje ve spojení s promotorovou sekvencí. To se týká také modifikovaných forem kódujících sekvencí, které se přirozeně vyskytují spojeny s předmětným promotorem. Tudiž sekvence kódující modifikovanou, k inhibitoru rezistentní protox, je považována za heterologní vzhledem k promotoru, který se přirozeně vyskytuje ve spojení se sekvencí kódující nemodifikovanou, k inhibitoru citlivou formu. Dále se to týká promotoru podle vynálezu operativně spojeného s kódující sekvencí z jiného rostlinného druhu nebo jiného organismu, než rostliny.

Termín „podstatná sekvenční homologie“ se užívá k vyjádření toho, že nukleotidová sekvence (v případě DNA nebo RNA) nebo sekvence aminokyselin (v případě proteinu nebo polypeptidu) vykazuje podstatnou strukturní a funkční shodu s jinou nukleotidovou nebo aminokyselinovou sekvencí. Jakékoliv funkční nebo strukturní rozdíly mezi sekvencemi s podstatnou sekvenční homologií budou mít minimální význam a neovlivní schopnost sekvence působit tak, jak je popsáno v předkládané přihlášce. Tak např. sekvence, která vykazuje podstatnou sekvenční homologii se sekvencí DNA, která je popsána jako protox promotor, povede ke stejné úrovni a stejnému vzorci exprese příslušné sekvence DNA, jaké poskytuje rostlinný protox promotor. Sekvence, které mají podstatnou sekvenční homologii se sekvencemi popsanými v předkládaném vynálezu, jsou obvykle varianty popsanych sekvencí, jako např. mutace, ale mohou to také být syntetické sekvence. Strukturní rozdíly se považují za minimální, pokud existuje významný sekvenční překryv nebo podobnost mezi dvěma nebo více různými sekvencemi nebo pokud různé sekvence mají podobné fyzikální vlastnosti. Takové vlastnosti zahrnují

např. imunologickou reaktivitu, enzymovou aktivitu, strukturní integritu proteinu apod.

Dvě nukleotidové sekvence mají podstatnou sekvenční homologii, pokud sekvence sdílejí přinejmenším 70%, výhodněji 80% a nejvýhodněji 90% podobnost sekvencí. Dvě aminokyselinové sekvence mají podstatnou sekvenční homologii, pokud sdílejí alespoň 50%, výhodněji 70% a nejvýhodněji 90% podobnost mezi aktivními částmi polypeptidů. V případě promotorových sekvencí DNA, „podstatná sekvenční homologie“ se také vztahuje k takovým fragmentům promotorové sekvence DNA, které jsou schopny působit tak, že spouštějí expresi připojených sekvencí DNA. Takové operativní fragmenty promotorových sekvencí DNA se mohou odvodit z promotorové sekvence DNA, např. štěpením promotorové sekvence DNA restrikcčními enzymy, syntézou DNA podle promotorové sekvence nebo se mohou získat pomocí technologie PCR (Mullis et al., Meth. Enzymol. 155: 335-350, 1987, Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press, New York, 1989).

Promotorová sekvence je „operativně spojena“ s druhou sekvencí DNA, pokud jsou tyto sekvence orientovány tak, že promotorová sekvence DNA ovlivňuje transkripci nebo translaci druhé sekvence DNA. Tak např. pokud druhá DNA sekvence kóduje protein, promotorová sekvence DNA je operativně spojena s touto druhou sekvencí DNA, jestliže promotorová sekvence ovlivňuje expresi proteinového produktu z druhé sekvence DNA. Např. v sekvenci DNA, obsahující promotorovou sekvenci DNA fyzicky spojenou s kódující sekvencí DNA v témže chimérickém konstruktu, jsou tyto sekvence pravděpodobně operativně spojeny.

Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká promotorových sekvencí DNA, které jsou přirozeně spojeny s kódujícími sekvencemi pro rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu (označovanou zde „protox“, viz Mezinárodní patentová přihláška PCT/IBP95/00452 podaná 8. června 1995 a publikovaná 21. prosince 1995 jako WO 95/34659, zahrnutá jako celek do odkazů, a dále současně tentýž den podaná Mezinárodní patentová přihláška s názvem „Molekuly DNA kódující rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu a její mutanty rezistentní k inhibitoru“ (rejstříkové č. PH/5-20757/P1/CGC1847), také plně zahrnuta v odkazech). Protox promotorové sekvence byly shledány velmi užitečnými pro expresi heterologní kódující sekvence v rostlině.

Promotorová sekvence ze sekvence kódující protox-1 v *Arabidopsis thaliana* (sekvence i. č. 1) je popsána jako sekvence i. č. 13. Izolace tohoto promotoru z genomové knihovny pomocí spojených kódujících sekvencí jakožto sondy je popsána v příkladu 1. Promotorová sekvence ze sekvence kódující protox-1 v kukuřici (sekvence i. č. 5) je popsána jako sekvence i. č. 14. Izolace tohoto promotoru z genomové knihovny pomocí spojených kódujících sekvencí jakožto sondy je popsána v příkladu 4. Promotorová sekvence ze sekvence kódující protox-1 řepy cukrovky (sekvence i. č. 17) je popsána jako sekvence i. č. 26. Izolace tohoto promotoru z genomové knihovny pomocí spojených kódujících sekvencí jakožto sondy je popsána v příkladu 11.

Na základě informací, které poskytuje předkládaný vynález, je možné postup izolace protox-1 promotorů z *Arabidopsis* a kukuřice použít k izolaci promotorových sekvencí u jakéhokoliv rostlinného protox genu. Jakákoliv sekvence kódující protox, která sdílí dostatečnou homologii, aby hybridizovala s protox kódující sekvencí spojenou

s hledaným promotorem, se může použít jako sonda podle tohoto postupu. Vzhledem k tomu, že sekvence protox-1 a protox-2 ze všech rostlin mají zřejmě požadovaný stupeň homologie, výběr vhodné protox kódující sekvence jako sondy není považován za kritický bod. Avšak pro optimální výsledek hybridizace je výhodné použít co neblíže příbuznou protox kódující sekvenci. Nejvýhodnější je použít jako sondu kódující sekvenci z téhož rostlinného druhu jako je hledaný promotor a kódující sekvenci přirozeně spojenou s promotorem.

Předkládaný vynález se týká izolované promotorové molekuly DNA, která je přirozeně spojena s kódující sekvencí rostlinné protoporfyrinogenoxidázy. Výhodná je izolovaná promotorová molekula DNA, která je přirozeně spojena s kódující sekvencí pro rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu z rostlin ze skupiny, kam patří *Arabidopsis*, cukrová třtina, soja, ječmen, bavlník, tabák, řepa cukrovka, řepka olejka, kukuřice, pšenice, čirok, žito, oves, travníkové a pícninové trávy, proso a rýže. Výhodnější je izolovaná promotorová molekula DNA, která je přirozeně spojena s kódující sekvencí pro rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu z rostlin ze skupiny, kam patří *Arabidopsis*, soja, bavlník, tabák, řepa cukrovka, řepka olejka, kukuřice, pšenice, čirok, žito, oves, travníková tráva (jílek) a rýže. Zvláště výhodná je izolovaná promotorová molekula DNA, která je přirozeně spojena s kódující sekvencí pro rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu z rostlin ze skupiny, kam patří *Arabidopsis*, řepa cukrovka a kukuřice. Nejvýhodnější je izolovaná promotorová molekula DNA, která je přirozeně spojena s kódující sekvencí pro rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu z *Arabidopsis*. Nejvýhodnější je izolovaná promotorová molekula DNA, která je přirozeně spojena s kódující sekvencí pro rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu z kukuřice. Nejvýhodnější je

25.08.98

- 14 -

izolovaná promotorová molekula DNA, která je přirozeně spojena s kódující sekvencí pro rostlinnou proto-porfyrinogenoxidázu z řepy cukrovky.

Předkládaný vynález se dále týká molekul DNA, které hybridizují s molekulami DNA podle vynálezu, jak jsou výše definovány, a výhodně s oligonukleotidovou sondou, kterou lze získat z uvedené molekuly DNA obsahující souvislou část sekvence protox promotoru o délce alespoň 10 nukleotidů, a to za průměrně stringentních podmínek. Nejvýhodnější jsou molekuly DNA, které hybridizují s nukleotidovými sekvencemi i.č. 13 (protox-1 promotor z *Arabidopsis*), i.č. 14 (protox-1 promotor z kukuřice) nebo i.č. 26 (protox-1 promotor z řepy cukrovky) za následujících podmínek:

- a) hybridizace v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS), 0,5M NaPO₄ s pH 7,0, 1mM EDTA při 50 °C, a
- b) promytí ve 2x SSC, 1% SDS při 50 °C .

Faktory, které ovlivňují stabilitu hybridů, určují stringentnost (přísnost) podmínek hybridizace. Jedním z takových faktorů je teplota tání T_m , která se dá snadno vypočítat podle vzorce popsaného v „DNA Probes“ (Keller, George H., Manak, Mark M., MacMillan Publishers Ltd, 1993, kapitola první: „Molecular Hybridization Technology“, s. 8). Výhodná hybridizační teplota je v rozmezí přibližně 25 °C pod vypočtenou teplotou tání T_m a výhodně v rozmezí přibližně 12 až 15 °C pod vypočtenou teplotou tání T_m , a v případě oligonukleotidů v rozmezí přibližně 5 až 10 °C pod teplotou tání T_m .

Další provedení vynálezu je způsob přípravy molekuly DNA, která se skládá z úseku DNA obsahujícího sekvenci protox promotoru a úseku DNA kódujícího protox protein, obsahující a) přípravu nukleotidové sondy schopné specifické hybridizace s rostlinným protox genem nebo mRNA, kde sonda obsahuje

souvislý úsek kódující sekvence protox proteinu nebo protox promotorové sekvence z rostliny délky nejméně 10 nukleotidů

b) vyhledání dalších protox kódujících sekvencí v populacích klonovaných fragmentů genomové DNA nebo fragmentů cDNA z vybraného organismu pomocí sondy připravené podle kroku a)

c) izolace a namnožení molekuly DNA skládající se z úseku DNA obsahujícího protox promotorovou sekvenci a úseku DNA kódujícího protox protein.

Další provedení vynálezu je způsob přípravy molekuly DNA, která obsahuje úsek DNA obsahující sekvenci protox promotoru, obsahující

a) přípravu nukleotidové sondy schopné specifické hybridizace s rostlinným protox genem nebo mRNA, kde sonda obsahuje souvislý úsek kódující sekvenci protox proteinu z rostliny délky nejméně 10 nukleotidů

b) vyhledání dalších protox kódujících sekvencí nebo protox promotorových sekvencí v populacích klonovaných fragmentů genomové DNA nebo fragmentů cDNA z vybraného organismu pomocí sondy připravené podle kroku a)

c) izolace a namnožení molekuly DNA obsahující úsek DNA obsahující protox promotorovou sekvenci.

Další provedení vynálezu je způsob přípravy molekuly DNA obsahující úsek DNA obsahující sekvenci protox promotoru z kteréhokoli rostlinného protox genu, obsahující

a) přípravu nukleotidové sondy schopné specifické hybridizace s rostlinným protox genem nebo mRNA, kde sonda obsahuje souvislý úsek kódující sekvence protox proteinu nebo protox promotorové sekvence z rostliny délky nejméně 10 nukleotidů

b) vyhledání dalších protox kódujících sekvencí v populacích klonovaných fragmentů genomové DNA nebo cDNA fragmentů z vybraného organismu pomocí sondy připravené podle kroku a)

c) izolace a namnožení molekuly DNA obsahující úsek DNA obsahující protox promotorovou sekvenci.

Další provedení vynálezu je použití nukleotidové sondy schopné specifické hybridizace s rostlinným protox genem nebo mRNA o délce alespoň 10 nukleotidů v polymerázové řetězové reakci (PCR), kde sonda může být získána buď z kódujícího úseku nebo promotorového úseku protox genu.

Další provedení vynálezu je použití nukleotidové sondy schopné specifické hybridizace s rostlinným protox genem nebo schopné mapovat polohu protox genu(ů) v genomu vybrané rostliny pomocí standarních postupů založených na selektivní hybridizaci sondy a genomové protox sekvence.

Další provedení vynálezu je použití protox kódující sekvence, která sdílí dostatečnou homologii k tomu, aby hybridizovala s protox kódující sekvencí spojenou s hledaným promotorem, jako sondy. Výhodné je použití protox kódující sekvence, kde kódující sekvence užitá jako sonda je ze stejného rostlinného druhu jako hledaný protox promotor a je to kódující sekvence přirozeně spojená s promotorem.

Rostlinný protox promotor podle předkládaného vynálezu zahrnuje sekvenci protox-1 promotoru z *Arabidopsis thaliana*, uvedenou zde jako sekvenci i. č. 13, sekvenci protox-1 promotoru ze *Zea mays* (kukuřice), uvedenou zde jako sekvenci i. č. 14, sekvenci protox-1 promotoru z řepy cukrovky, uvedenou zde jako sekvenci i. č. 26, a dále také odpovídající protox-1 promotorové sekvence dostupné z dalších rostlinných druhů, jak bylo již dříve uvedeno. Předkládaný vynález také zahrnuje funkční fragmenty těchto sekvencí DNA, které zachovávají schopnost regulovat expresi operativně spojené kódující sekvence stejným způsobem jako příkladná protox promotorová sekvence. Takové funkční fragmenty lze identifikovat pomocí deleční analýzy nebo jiného standardního

způsobu známého v oboru pro identifikaci protox promotorové aktivity (viz s. 546-549, „Genes“, Lewin (ed.), Oxford Univ. Press, 1990). Předkládaný vynález také zahrnuje sekvence DNA, které mají podstatnou sekvenční homologii s protox promotory dostupnými z rostlinných genů, které působí shodnou úroveň a vzorec exprese operativně spojené sekvence. Takové promotorové sekvence se mohou získat modifikací protox promotorů izolovaných z rostlinných genů a jsou považovány za funkčně shodné deriváty rostlinných protox promotorů.

Jak ilustrují příklady dále uvedené, sekvence DNA, vektory a transgenní rostlinny podle předkládaného vynálezu obsahují promotorovou sekvenci odvozenou z rostlinného protox genu. Protox promotorová sekvence DNA je výhodně operativně spojena s kódující sekvencí DNA, např. se sekvencí DNA, která je přepisována do užitečného transkriptu RNA jako je např. protisměrný „antisense“ transkript, nebo kódující sekvence, která je exprimována a poskytuje užitečný proteinový produkt.

Ve výhodné provedení vynálezu je protox promotor užit k řízení exprese modifikovaného enzymu, který je cílem pro herbicid, a který je rezistentní k herbicidu v hladině, která inhibuje odpovídající nemodifikovanou verzi enzymu. Vynález se týká použití protox promotoru v rostlině pro expresi k herbicidu rezistentní formy proteinů, které jsou cílem herbicidu, čímž rostlina získává toleranci k herbicidu. Takové modifikované enzymy rezistentní k herbicidu zahrnují k herbicidu rezistentní formy imidazolglycerolfosfát-dehydratázy (IGPD, viz. WO 9426909 publikovaná 24. listopadu 1994), EPSPsyntázy (viz. U. S. Patenty č. 4 535 060, 4 769 061, 4 940 835 a EP 550 633), glutaminsyntetázy (GS, viz U.S. Patent č. 4 975 374), acetylkoenzym-A-karboxylázy (ACCáza, viz. U.S. Patent č. 5 162 602) a acetolaktátsyntázy

(viz U.S. Patenty č. 4 761 373, 5 304 732, 5 331 107, 5 013 659, 5 141 870 a 5 378 824). V nejvýhodnějším provedení vynálezu je protox promotor použit k řízení exprese modifikovaného protox enzymu, který je rezistentní k protox inhibitorům jak je pro ilustraci uvedeno v příkladech 2 a 3 (viz také Mezinárodní patentová přihláška PCT/IB95/00452 podaná 8. června 1995 a publikovaná 21. prosince 1995 jako WO 95/34659, na jejíž relevantní části se zde odkazujeme, a současně podaná přihláška „Molekuly DNA kódující rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu a její mutanty rezistentní k inhibitoru“).

Vynález se týká chimérického genu, který obsahuje expresní kazetu skládající se z rostlinného protox promotoru operativně spojeného s heterologní kódující sekvencí. Výhodný je takový chimérický gen, kde rostlinný protox promotor je z genu protox-1 nebo protox-2. Zvláště výhodný je takový chimérický gen, kde rostlinný protox promotor je z protox-1 genu. Zvláště výhodný je takový chimérický gen, kde rostlinný protox promotor je z protox-2 genu.

Výhodný je chimérický gen, kde protox promotor je z rostliny vybrané ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, cukrovou třtinu, soju, ječmen, bavlník, tabák, řepu cukrovku, řepku olejku, kukuřici, pšenici, čirok, žito, oves, travníkové a pícninové trávy, proso a rýži. Výhodnější je chimérický gen, kde protox promotor je z rostliny vybrané ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, soju, ječmen, bavlník, tabák, řepu cukrovku, řepku olejku, kukuřici, pšenici, čirok, žito, oves, jílek, proso a rýži. Zvláště výhodný je chimérický gen, kde protox promotor je z rostliny vybrané ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, kukuřici a řepu cukrovku. Výhodnější je chimérický gen, kde protox promotor je z rostliny vybrané ze skupiny obsahující *Arabidopsis* a kukuřici. Nejvýhodnější

je chimérický gen, kde rostlinný protox promotor má sekvenci uvedenou jako sekvenci i. č. 13. Nejvýhodnější je chimérický gen kde rostlinný protox promotor má sekvenci uvedenou jako sekvenci i. č. 14. Nejvýhodnější je chimérický gen, kde rostlinný protox promotor má sekvenci uvedenou jako sekvenci i. č. 26. Výhodný je chimérický gen, kde rostlinný protox promotor má velikost alespoň 500 nukleotidů, výhodněji alespoň 300 nukleotidů.

Výhodný je chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z *Arabidopsis*, který má protox-1 nebo protox-2 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinové sekvence uvedené jako sekvence i.č. 2 a sekvence i.č. 4. Výhodný je také chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z kukuřice, který má protox-1 nebo protox-2 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinové sekvence uvedené jako sekvence i.č. 6 a sekvence i.č. 8. Výhodný je také chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z pšenice, který má protox-1 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvenci i.č. 10. Výhodný je také chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein ze soji, který má protox-1 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvenci i.č. 12. Výhodný je také chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z bavlníku, který má protox-1 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvenci i.č. 16. Výhodný je také chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z řepy cukrovky, který má protox-1 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvenci i.č. 18. Výhodný je také chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z řepky olejky, který má protox-1 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvenci

i.č. 20. Výhodný je také chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z rýže, který má protox-1 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvenci i.č. 22. Výhodný je také chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z čiroku, který má protox-1 aktivitu, výhodně protein obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvenci i.č. 24.

Vynález se dále týká chimérického genu, který obsahuje expresní kazetu skládající se z rostlinného protox promotoru operativně spojeného s molekulou DNA kódující rostlinný protein, který je rezistentní k herbicidu v hladině, která inhibuje odpovídající nemodifikovanou verzi enzymu.

Výhodný je chimérický gen, kde heterologní kódující sekvence kóduje modifikovanou, k herbicidu rezistentní formu rostlinného enzymu. Zejména výhodný je chimérický gen, kde rostlinný enzym je vybrán ze skupiny obsahující imidazolglycerolfosfátdehydratázu (IGPD), 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázu (EPSP), glutaminsyntetázu (GS), acetylkoenzym-A-karboxylázu, acetolaktátsyntázu, hystidinol-dehydrogenázu a protoporfyrinogenoxidázu (protox). Výhodnější je chimérický gen, kde rostlinný enzym je vybrán ze skupiny obsahující imidazolglycerolfosfátdehydratázu (IGPD), 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázu (EPSP), glutaminsyntetázu (GS), acetylkoenzym-A-karboxylázu, acetolaktátsyntázu a protoporfyrinogenoxidázu (protox).

Zvláště výhodný je chimérický gen, kde rostlinný enzym je eukaryotická protox. Výhodnější je chimérický gen, kde rostlinný enzym je eukaryotická protox, která má aminokyselinové substituce, přičemž tyto substituce jí dávají vlastnost rezistence k protox inhibitoru. Nejvýhodnější je chimérický gen, kde rostlinný enzym je eukaryotická protox podle již zmíněné současně podané patentové přihlášky nazvané

„Molekuly DNA kódující rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu a její mutanty rezistentní k inhibitoru“, kde protox je rezistentní k protox inhibitoru.

Výhodný je chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z rostliny, která je vybrána ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, cukrovou třtinu, soju, ječmen, bavlník, tabák, řepu cukrovku, řepku olejku, kukuřici, pšenici, čirok, žito, oves, travníkové a pícninové trávy, proso, pícniny a rýži. Výhodnější je chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z rostliny, která je vybrána ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, soju, ječmen, bavlník, řepu cukrovku, řepku olejku, kukuřici, pšenici a čirok. Zvláště výhodný je chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z rostliny, která je vybrána ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, pšenici, soju a kukuřici. Nejvýhodnější je chimérický gen, kde molekula DNA kóduje protein z rostliny, která je vybrána ze skupiny obsahující soju a pšenici.

Vynález se dále týká použití chimérického genu podle vynálezu pro expresi k herbicidu rezistentní formy rostlinného protox proteinu, který je rezistentní k inhibitoru nemodifikovaného rostlinného protox proteinu. Vynález se dále týká trvalé integrace chimérického genu do genomu hostitele. Vynález se týká rekombinantní molekuly DNA obsahující promotor rostlinné protoporfyrinogenoxidázy (protox) nebo jejího funkčně shodného drivátu. Vynález se dále týká rekombinantního DNA vektoru, který obsahuje rekombinantní molekulu DNA.

Dalším předmětem vynálezu je rekombinantní vektor obsahující zmíněný chimérický gen, přičemž tento vektor může být trvale transforomován do rostliny, rostlinných semen, rostlinného pletiva nebo rostlinné buňky. Rostlina a její potomstvo, rostlinná semena, rostlinné pletivo nebo rostlinná

buňka trvale transformované vektorem jsou schopny exprimovat molekulu DNA kódující požadovaný protein, který může pocházet z rostlinného nebo i z jiného než rostlinného zdroje, ale výhodně z rostliny. Výhodný je rekombinantní vektor takový, že rostlina a její potomstvo, semena, rostlinné pletivo nebo rostlinná buňka trvale transformované tímto vektorem jsou schopny exprimovat molekulu DNA kódující požadovaný protein, který může pocházet z rostlinného nebo i z jiného než rostlinného zdroje, výhodně z rostliny, a který je rezistentní k herbicidům v úrovni, která inhibuje odpovídající nemodifikovanou verzi enzymu.

Předkládaný vynález se dále týká transgenního rostlinného pletiva rostliny, včetně celých rostlin, a také potomstva, semen nebo kultivovaného pletiva, trvale transformovaných alespoň jedním chimérickým genem podle vynálezu. Výhodné je transgenní rostlinné pletivo, včetně rostliny, semen nebo kultivovaného pletiva, trvale transformované alespoň jedním chimérickým genem, který obsahuje expresní kazetu obsahující rostlinný protox promotor operativně spojený s kódující sekvencí DNA schopnou exprimovat protein, který může být i z jiného zdroje než rostliny nebo z rostliny, výhodně však z rostliny, která je rezistentní k herbicidům v úrovni, která inhibuje odpovídající nemodifikovanou verzi enzymu v rostlinném pletivu.

Předkládaný vynález také zahrnuje hostitelskou buňku trvale transformovanou vektorem podle vynálezu, kde hostitelská buňka je schopna exprimovat molekulu DNA. Výhodná je hostitelská buňka vybraná ze skupiny obsahující rostlinnou buňku, bakteriální buňku, kvasinkovou buňku nebo hmyzí buňku.

Předkládaný vynález se dále týká rostlin a jejich potomstva, rostlinného pletiva a rostlinných semen

tolerantních k herbicidu, který inhibuje přirozeně se vyskytující protox aktivitu v těchto rostlinách, u nichž je tolerance vnesena genem exprimujícím modifikovaný, k herbicidu rezistentní, protox gen, jak je vyloženo v této přihlášce. Reprezentativní rostliny zahrnují všechny rostliny, na které jsou tyto herbicidy normálně aplikovány. Výhodné jsou agronomicky důležité plodiny, rostliny nahosemenné nebo krytosemenné, jako je např. *Arabidopsis*, soja, cukrová třtina, ječmen, bavlník, tabák, řepa cukrovka, řepka olejka, kukuřice, pšenice, čirok, žito, oves, travníkové a pícninové trávy, proso, rýže a další. Výhodnější jsou agronomicky důležité plodiny, rostliny nahosemenné nebo krytosemenné, jako je *Arabidopsis*, bavlník, soja, řepka olejka, řepa cukrovka, tabák, kukuřice, rýže, pšenice, oves, žito, čirok a jilek. Zvláště výhodné jsou agronomicky důležité plodiny, rostliny nahosemenné nebo krytosemenné, jako je *Arabidopsis*, bavlník, soja, řepka olejka, řepa cukrovka, kukuřice, pšenice, čirok a rýže.

Transgenní rostliny podle předkládaného vynálezu se mohou transformovat libovolným způsobem transformace známým v oboru. Takové způsoby zahrnují např. transformaci přímou infekcí nebo ko-kultivací rostlin, rostlinného pletiva nebo buňky s *Agrobacterium tumefaciens* (Horsch et al., Science 225: 1229, 1985, Marton, „Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants“, Vol. 1, s. 514-521, 1984), přímým transferem genu do protoplastů (Paszowski et al., EMBO J. 12: 2717, 1984, Loerz et al., Mol. Gen. Genet. 1119: 178, 1985, Fromm et al., Nature 319: 719, 1986), bombardováním mikročásticemi (Klein et al., Bio/Technology 6: 559-563, 1988), injekcí do protoplastů kultivovaných buněk a pletiv (Reich et al., Bio/technology 4: 1001-1004, 1986) nebo injekcí do meristemových pletiv semenáčků a rostlin jak

popisují De La Pena et al. (Nature 325: 274-276, 1987), Hooykaas-Van Slogteren et al. (Nature 311: 763-764, 1984), Grimsley et al. (Bio/technology 6: 185, 1988) a Grimsley et al. (Nature 325: 177, 1988).

Genetické vlastnosti vnášené metodami genového inženýrství do transgenních semen a rostlin popsanych výše, jsou předávány sexuální reprodukcí nebo vegetativním růstem a mohou se tak udržovat a propagovat v dceřinných rostlinách. Obecně se pro udržování a propagaci využijí způsoby vyvinuté v zemědělství pro specifické účely jako je orání, setí nebo sklizeň. Specializované způsoby jako je hydroponická nebo skleníková technologie, se mohou také použít. Jelikož rostoucí plodiny jsou náchylné k napadení a poškození hmyzem nebo infekcemi a také kompeticí s plevely, provedou se opatření ke kontrole plevelů, nemocí, hmyzu, červů a další, vedoucí ke zvýšení výnosu. To zahrnuje také taková mechanická opatření jako je orání půdy nebo odstraňování plevelů a infikovaných rostlin, a také aplikaci agrochemikálií jako jsou herbicidy, fungicidy, gametocidy, nematocidy, růstové regulátory, činidla k dozrávání a insekticidy.

Výhodné genetické vlastnosti transgenních rostlin a semen podle vynálezu se mohou využít ve šlechtění rostlin, jehož cílem je vyvinout rostliny se zlepšenými vlastnostmi jako je např. tolerance k hmyzu, herbicidům nebo stresu, se zlepšenou nutriční hodnotou, zvýšeným výnosem nebo zlepšenou strukturou, která vede ke snížení ztrát způsobených poléháním nebo polámáním. Jednotlivé šlechtitelské kroky jsou charakterizovány jasně definovanou lidskou činností, jako je např. výběr linií ke křížení, přímé opylování rodičovských linií nebo výběr vhodného potomstva. V závislosti na požadovaných vlastnostech se provádějí různá šlechtitelská opatření. Odpovídající způsoby jsou v oboru dobře známy

a zahrnují (kromě jiného) např. hybridizaci, inbreeding, zpětné křížení, víceliniové křížení, směsné odrůdy, mezidruhovou hybridizaci, aneuploidní techniky atd. Hybridizační techniky zahrnují také sterilizaci rostlin vedoucí k samčím nebo samičím sterilním rostlinám, která se provádí mechanickými, chemickými nebo biochemickými prostředky. Křížové opylení samčí sterilní rostliny pylem různých linií zajistí, že genom rostliny se samčí sterilitou a se zachovanou samičí fertilitou uniformně získá vlastnosti obou rodičovských linií. Tudiž transgenní osivo a rostliny podle vynálezu se mohou užít ve šlechtění linií zlepšených rostlin, což např. může zvýšit účinnost konvenčních metod jako je ošetření herbicidem nebo pesticidem, a nebo se obejdou bez těchto metod vzhledem k jejich modifikovaným genetickým vlastnostem. Případně nové plodiny se zlepšenou tolerancí k stresu se mohou získat tak, že vzhledem k jejich optimalizovanému genetickému „vybavení“ je sklizený produkt lepší kvality než produkty, které nebyly schopny tolerovat srovnatelně nepříznivé vývojové podmínky.

V semenářství jsou kvalita klíčení a uniformita osiva nezbytnými charakteristikami produktu, zatímco kvalita klíčení a uniformita semen sklizených a prodávaných farmáři nejsou tak důležité. Jelikož je obtížné udržovat plodinu v čistém stavu bez příměsi semen jiné plodiny nebo plevelu, kontrolovat nemoci přenášené semeny, a produkovat osivo s dobrou kvalitou klíčení, značně obsáhlé a dobře definované techniky výroby osiva byly vyvinuty producenty osiva, kteří mají zkušenosti s pěstováním, udržováním a prodejem čistého osiva. Je běžnou praxí, že farmář kupuje certifikované osivo odpovídající kvalitativním standardům, místo aby používal osivo z vlastní úrody. Materiál používaný jako osivo je obvykle ošetřen ochrannou vrstvou obsahující herbicidy,

insekticidy, fungicidy, baktericidy, nematicidy, moluscicidy nebo jejich různé směsi. Obvykle užívané ochranné vrstvy obsahují sloučeniny jako kaptan, karboxin, thiram (TMTD®), metalaxyl (Apron®) a pirimifosmetyl (Actellic®). Pokud je to potřeba, tyto sloučeniny tvoří prostředek společně s dalšími pomocnými látkami, nosiči, surfaktanty nebo adjuvans usnadňujícími aplikaci, jak se běžně užívá v oboru prostředků pro ochranu před poškozením bakteriálními, houbovými nebo živočišnými škůdci. Ochranná vrstva se může aplikovat impregnací osiva tekutým prostředkem nebo kombinovanou aplikací kapalného a suchého prostředku. Jiné způsoby aplikace lze také použít, např. přímé ošetření pupenů nebo plodů.

Další aspekt předkládaného vynálezu poskytuje nové zemědělské způsoby, jak je uvedeno výše, které jsou charakterizovány použitím transgenních rostlin, transgenního rostlinného materiálu nebo transgenního osiva podle předkládaného vynálezu. Vynález poskytuje takové zemědělské způsoby, kde se užívá transgenní rostlina nebo její potomstvo, které obsahují chimérický gen podle vynálezu v množství dostatečném pro expresi k herbicidu rezistentní formy cílových proteinů herbicidu v rostlině, což poskytuje toleranci k herbicidu.

Pro vypěstování/vyšlechtění potomstva rostlin transformovaných způsobem podle vynálezu lze užít následující postup. Rostliny kukuřice, získané jak je popsáno v dále uvedených příkladech, se pěstují v nádobách ve skleníku nebo v půdě tak, jak je v oboru známo, a ponechají se kvést. Ze zralých samčích vláken se získá pyl a použije se k opylení klasu téže rostliny, sesterské rostliny nebo jakékoliv jiné požadované rostliny kukuřice. Stejně tak klas vyvíjející se na transformované rostlině se může opylit pylem

z téže rostliny, sesterské rostliny nebo jakékoliv jiné požadované rostliny kukuřice. Transformované potomstvo získané tímto způsobem se dá odlišit od netransformovaného potomsta tím, že obsahuje vnesený gen (geny) a/nebo srovnáním genomových DNA (genotypů) nebo příslušných fenotypů. Transformované potomstvo může být samosprášeno nebo kříženo s jinými rostlinami, tak jak se to dělá normálně s jakoukoliv rostlinou nesoucí požadovaný znak. Podobně tabák nebo jiná transformovaná rostliny získaná tímto způsobem se může samosprášit nebo křížít způsobem známým v oboru, aby se získalo potomstvo požadovaných vlastností. Podobně také další transgenní organismy získané kombinací způsobů známých v oboru se způsoby podle vynálezu se mohou šlechtit způsoby v oboru známými, aby se získalo potomstvo požadovaných vlastností.

Vynález je podrobněji ilustrován v následujících příkladech, přičemž tyto příklady ho nijak neomezují.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace promotorové sekvence Protox-1 z *Arabidopsis thaliana*
Genomová knihovna Lambda Zap II z *Arabidopsis thaliana* (Columbia, celá rostlina) byla zakoupena od firmy Stratagene. Přibližně 125 000 fágů bylo vyseto v hustotě 25 000 pfu („plaque forming units“, jednotek tvořících plaky) na 15cm Petriho misku a duplikáty byly otisknuty na membránu Colony/Plaque Screen (NEN DuPont). Duplikáty plaků pak byly testovány pomocí sondy Protox-1 cDNA z *Arabidopsis* (sekvence i. č. 1) značené ³²P-dCTP metodou náhodných primerů (Life Technologies). Hybridizace a odmývání proběhly při 65 °C za podmínek popsaných v Church a Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 81: 1991-1995, 1984. Pozitivně hybridizující plaky byly přečištěny a byly z nich vystřiženy plazmidy pBluescript. Sekvence inzerťů genomové DNA byly stanoveny řetězovou terminační reakcí pomocí dideoxyterminátorů značených fluorescenční barvou (Applied Biosystems, Inc.). Jeden klon, a sice AraPT1pro, byl identifikován jako klon obsahující 580 bp dlouhý úsek sekvence z *Arabidopsis*, orientovaný proti směru transkripce od iniciačního methioninu (ATG) proteinu Protox-1 z *Arabidopsis*. Tento klon obsahuje také kódující sekvenci a introny zasahující až k 1241 bp sekvence Protox-1 cDNA. 5'koncový nekódující fragment o délce 580 bp je domnělý Protox-1 promotor z *Arabidopsis* a jeho sekvence je zde uvedena jako sekvence i.č. 13.

Plazmid AraPT1Pro byl uložen 14. prosince 1995 jako pWDC-11 (NRRL č. B-21515).

Příklad 2

Konstrukce rostlinných transformačních vektorů exprimujících změněný gen Protox-1 za nativním Protox-1 promotorem z *Arabidopsis*

cDNA plné délky příslušné změněné protox-1 cDNA byla izolována jako fragment po částečném štěpení EcoRI-XhoI a klonována do rostlinného expresního vektoru pCGN1761ENX (viz Příklad 9 Mezinárodní patentové přihlášky PCT/IB95/00452, podané 8. 6. 1995, publikované 21. 12. 1995 jako WO 95/34659). Plazmid byl štěpen NcoI a BamHI, čímž vznikl fragment obsahující úplnou protox-1 cDNA a terminátor transkripce ze 3'koncové netranslatované sekvence genu *tml* z *Agrobacterium tumefaciens*. Plazmid AraPT1Pro popsáný výše se štěpil NcoI a BamHI aby se získal fragment obsahující pBluescript a fragment o délce 580 bp obsahující domnělý Protox-1 promotor. Ligací (spojením) těchto dvou fragmentů

vznikla fúzovaná molekula, kde změněná protox cDNA je připojena za nativní protox promotor. Expresní kazeta, obsahující „Protox-1 promotor/Protox-1 cDNA/tml terminátor“, je vytržena pomocí KpnI a klonována do binárního vektoru pCIB200. Binární plazmid je transformován elektroporací do *Agrobacterium* a pak do *Arabidopsis* použitím vakuové infiltrační metody (Bechtold et al., C.R.Acad. Sci. Paris 316: 1194-1199, 1993). Transformanty exprimující změněné geny protox se selektují na kanamycinu nebo na různých koncentracích herbicidu inhibujícího protox.

Příklad 3

Příprava rostlin tolerantních k herbicidu tím, že exprimují fúzovaný gen „nativní Protox-1 promotor/změněná Protox-1“

Užitím postupů uvedených výše byla Protox-1 cDNA z *Arabidopsis* obsahující záměnu TAC na ATG (tyrosin na methionin) v nukleotidech 1306 až 1308 sekvence Protox-1 (sekvence i.č. 1) spojena s nativním Protox-1 promotorovým fragmentem a transformována do *Arabidopsis thaliana*. Testy v bakteriálním expresní systému bylo ukázáno, že změněný Protox-1 enzym (AraC-2Met) je více než 10x více tolerantní k různým Protox-1 inhibujícím herbicidům než přirozeně se vyskytující enzym (viz také současně podaná Mezinárodní patentová přihláška „Molekuly DNA kódující rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu a její mutanty rezistentní k inhibitoru“, č. PH/5-20757/P1/CGC1847). Semena z vakuově infiltrovaných rostlin byla sebrána a vyseta v prostředí s protox inhibujícím aryluracylovým herbicidem (v rozmezí 10,0nM až 1,0μM) podle vzorce XVII. Opakované pokusy s divokým typem *Arabidopsis* ukázaly, že koncentrace 10 nM této sloučeniny je dostatečná k tomu, aby zabránila normálnímu klíčení semenáčků. Transgenní semena exprimující

změněný enzym AraC-2Met spojený s nativním Protox-1 promotorem vyklíčila v normální semenáčky při koncentraci herbicidu až 500nM, což dokazuje alespoň 50x vyšší toleranci k herbicidu ve srovnání s *Arabidopsis* divokého typu. Tento fúzovaný gen „promotor/změněný protox enzym“ působí také jako účinný selektovatelný marker pro rostlinnou transformaci. Několik rostlin, které vyklíčily na koncentraci 100 nM protox inhibujícího herbicidu bylo přesazeno do půdy, pěstováno 2 až 3 týdny a zkoušeno postřikovým testem s různými koncentracemi protox inhibujícího herbicidu. Pokud se srovnaly s kontrolními rostlinami transformovanými prázdným vektorem, transgenní rostliny AraPT1Pro/AraC-2Met měly toleranci k herbicidovému postřiku více než 10x vyšší.

Příklad 4

Izolace promotorové sekvence Protox-1 z kukuřice

Genomová knihovna kukuřice (*Zea mays*, inbrední linie Missouri 17, etiolované semenáčky) ve vektoru Lambda FIX II byla zakoupena od firmy Stratagene. Přibližně 250 000 fágů bylo vyseto v hustotě 50 000 pfu („plaque forming units“, jednotek tvořících plaky) na 15cm Petriho misku a duplikáty byly otisknuty na membránu Colony/Plaque Screen (NEN DuPont). Duplikáty plaků pak byly testovány pomocí sondy Protox-1 cDNA z kukuřice (sekvence i. č. 5) značené ^{32}P -dCTP metodou náhodných primerů (Life Technologies). Hybridizace a odmývání proběhly při 65 °C za podmínek popsaných v Church a Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995, 1984. Ze tří pozitivně hybridizujících plaků byl izolován fág lambda pomocí soupravy pro izolaci Wizard Lambda Preps DNA Purification System (Promega). Analýza užitím restrikčního štěpení, hybridizace a sekvenční analýzy DNA vedla k identifikaci klonu obsahujícího asi 3,5 kB genomové DNA

z kukuřice lokalizované na 5'-konci Protox-1 kódující sekvence již dříve izolované jako klon cDNA. Má se za to, že tento fragment obsahuje Protox-1 promotor kukuřice. Sekvence tohoto fragmentu je zde uvedena jako sekvence i.č. 14. Tato sekvence je od nukleotidu 1 k nukleotidu 3532 nekódující sekvencí. Nukleotidy 3533 až 3848 této sekvence kódují 5' konec proteinu Protox-1 z kukuřice.

Plazmid obsahující sekvenci i.č. 14 spojenou se zbytkem kódující sekvence Protox-1 z kukuřice byl uložen 19. března 1996 jako pWDC-14 (NRRL č. B-21546).

Příklad 5

Konstrukce vektorů pro transformaci rostlin

Existuje mnoho dostupných vektorů, které jsou vhodné pro transformaci rostlin a promotory nebo chimérické geny podle předkládaného vynálezu se mohou použít ve spojení s jakýmkoliv z těchto vektorů. Výběr vektoru bude záviset na zvolené technice transformace a na cílovém rostlinném druhu, který má být transformován. Pro některé cílové druhy mohou být výhodná různá antibiotika nebo herbicidy jako selekční markery. Selekční markery rutinně využívané v transformaci obsahují gen *nptII*, který je nositelem rezistence ke kanamycinu a příbuzným antibiotikům (Messing a Vierra, Gene 19: 259-268, 1982, Bevan et al., Nature 304: 184-187, 1983), gen *bar*, udílející rezistenci k fosfinotricinu (White et al., Nucl. Acids Res. 18: 1062, 1990, Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79: 625-631, 1990), gen *hph* udílející rezistenci k antibiotiku hygromycin (Blochinger a Diggelmann, Mol. Cell Biol. 4: 2929-2931) a gen *dhfr*, poskytující rezistenci k methotrexatu (Bououis et al., EMBO J. 2(7): 1099-1104, 1983).

I. Konstrukce vektorů vhodných pro transformaci prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

Existuje mnoho dostupných vektorů pro transformaci pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Tyto vektory typicky nesou alespoň jednu hraniční sekvenci z T-DNA a příkladem takových vektorů jsou např. pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 1984) a pXYZ. V následujícím odstavci je popsána konstrukce dvou typických vektorů.

Konstrukce vektorů pCIB200 a pCIB2001: Binární vektory pCIB200 a pCIB2001 byly užity pro konstrukci rekombinantních vektorů vhodných pro transformaci pomocí *Agrobacterium* a byly připraveny jak je dále popsáno. pTJS75kan byl vytvořen naštěpením pTJS75 NarI (Schmidhauser a Helinski, J. Bacteriol. 164: 446-455, 1985), čímž se vyštěpil gen tetracyklinové rezistence, a pak se vložil AccI fragment z pUC4K nesoucí NPTII (Messing a Vierra, Gene 19: 259-268, 1982, Bevan et al., Nature 304: 184-187, 1983, McBride et al., Plant Molecular Biology 14: 266-276, 1990). Linkery (spojky) XhoI byly ligovány k EcoRV fragmentu z pCIB7, který obsahuje levou i pravou hranici z T-DNA, rostlinný selektovatelný chimérický gen *nos/nptII* a polylinker pUC (Rothstein et al., Gene 53: 153-161, 1987), a fragment naštěpený XhoI byl klonován do pTJS75kan naštěpeného SalI, čímž vznikl pCIB200 (viz také EP 0 332 104, příklad 19(1338)). pCIB200 obsahuje následující jedinečná restriční místa v polylinkeru (vícečetném štěpném místě): EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI a SalI. pCIB2001 je derivát pCIB200, který byl vytvořen vložením dalších restričních míst do polylinkeru. Jedinečná restriční místa v polylinkeru pCIB2001 jsou EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI a SalI, MluI, BclI, AvrII, ApaI, HpaI a StuI. pCIB2001, kromě těchto dodatečných restričních míst, obsahuje geny pro

kanamycinovou selekci v bakteriích a rostlinách, levou a pravou hranici z T-DNA pro transformaci zprostředkovanou *Agrobacterium*, funkci *trfA* odvozenou z RK2 pro mobilizaci mezi *E. coli* a jinými hostiteli, a také funkce *OriT* a *OriV* z RK2. Polylinker pCIB2001 je vhodný pro klonování rostlinných expresních kazet obsahujících vlastní regulační signály.

Konstrukce plazmidu pCIB10 a jeho derivátů pro selekci hygromycinem: binární vektor pCIB10 obsahuje gen kódující kanamycinovou rezistenci pro selekci v rostlinách, sekvence levé a pravé hranice z T-DNA a sekvence z plazmidu pRK252 s širokým spektrem hostitelů, což mu dovoluje replikovat se jak v *E. coli* tak v *Agrobacterium tumefaciens*. Jeho konstrukci popsal Rothstein et al. (gene 53: 153-161, 1987). Byly konstruovány různé deriváty pCIB10, které obsahují gen pro hygromycin-B-fosfotransferázu, jak popsali Gritz et al. (Gene 25: 179-188, 1983). Tyto deriváty umožňují selekci transgenních rostlinných buněk pouze na hygromycinu (pCIB743) nebo na hygromycinu a kanamycinu (pCIB715 a pCIB717).

II. Konstrukce vektorů vhodných pro transformaci bez *Agrobacterium*

Transformace bez použití *Agrobacterium tumefaciens* obchází požadavek na přítomnost sekvencí T-DNA ve vybraném transformačním vektoru a tudíž vektory postarádající tyto sekvence se dají použít kromě vektorů obsahujících T-DNA popsaných výše. Techniky transformace, které nespolehají na *Agrobacterium*, zahrnují takové techniky transformace jako je bombardování mikročásticemi, příjem protoplasty (pomocí PEG nebo elektroporací) nebo mikroinjekce. Výběr vektorů závisí hlavně na způsobu selekce vybraného druhu, který má být

transformován. V následujícím odstavcích se popisuje konstrukce několika typických vektorů.

Konstrukce pCIB3064: pCIB3064 je vektor odvozený od pUC a je vhodný pro techniky přímého přenosu genů v kombinaci se selekcí pomocí herbicidu basta (fosfinotricinu). Plazmid pCIB246 obsahuje CaMV 35S promotor operativně spojený s genem GUS z *E. coli* a CaMV 35S transkripčním terminátorem jak je popsáno v Mezinárodní patentové přihlášce WO 93/07278. 35S promotor tohoto vektoru obsahuje dvě ATG sekvence na 5'-konci od startovacího místa. Tyto sekvence byly mutovány pomocí standardní PCR techniky tak, že oba kodony ATG byly odstraněny a vznikla tak restrikkční místa pro SspI a PvuII. Nová restrikkční místa jsou vzdálena 96 bp a 37 bp od jedinečného místa SalI a 101 bp a 42 bp od skutečného startovacího místa. Výsledný derivát plazmidu pCIB246 byl nazván pCIB3025. Gen GUS byl pak vystřižen z pCIB3025 štěpením SalI a SacI, konce byly zatupeny a byl znovu spojen, čímž vznikl plazmid pCIB3060. Plazmid pJIT82 byl získán z John Innes Centre, Norwich, a byl z něho vyštěpen SmaI fragment velikosti 400 bp obsahující gen *bar* ze *Streptomyces viridochromogenes*, a vložen do HpaI místa pCIB3060 (Thompson et al., EMBO J. 6: 2519-2523, 1989). Tak vznikl pCIB3064, který obsahuje gen *bar* pod kontrolou CaMV 35S promotoru a terminátoru pro selekci herbicidem, gen pro ampicilinovou rezistenci (pro selekci v *E. coli*) a polylinker s jedinečnými místy SphI, PstI, HindIII a BamHI. Vektor je vhodný pro klonování rostlinných expresních kazet obsahujících vlastní regulační signály.

Konstrukce pSOG19 a pSOG35: pSOG35 je transformační vektor, který využívá gen pro dihydrofolátreduktázu (DHFR) z *E. coli* poskytující rezistenci k methotrexatu jako selektovatelný marker. PCR byla užita pro amplifikaci 35S

promotoru (asi 800 bp), intronu 6 z genu *Adhl* kukuřice (asi 550 bp) a 18 bp úseku netranslatované vedoucí sekvence GUS z plazmidu pSOG10. Fragment dlouhý 250 bp kódující dihydrofolátreduktázu typu II z *E. coli* byl amplifikován také pomocí PCR a tyto dva fragmenty byly spojeny prostřednictvím ScaI-PstI fragmentu z pBI221 (Clontech), který obsahuje kostru vektoru pUC a terminátor nopalinsyntázového genu. Spojením fragmentů vznikl plazmid pSOG19, který obsahuje 35S promotor spojený se sekvencí intronu 6, GUS vedoucí sekvencí, genem DHFR a terminátorem nopalinsyntázy. Náhradou GUS vedoucí sekvence v pSOG19 vedoucí sekvencí z viru chlorotické skvrnitosti kukuřice (MCMV) vznikl vektor pSOG35. pSOG19 a pSOG35 nesou gen pro ampicilinovou rezistenci z pUC a mají místa HindIII, SphI, PstI a EcoRI dostupná pro klonování cizích sekvencí jako jsou např. chimérické genové sekvence obsahující rostlinný protox promotor.

Příklad 6

Konstrukce chimérických genů/rostlinných expresních kazet

Kódující sekvence zamýšlené pro expresi kontrolovanou protox promotorem v transgenních rostlinách se mohou vložit do expresní kazety za vhodný protox promotorem a před vhodný transkripční terminator. Výsledný chimérický gen pak může být snadno přenesen do některého z rostlinných transformačních vektorů popsaných v příkladu 5.

I. Výběr protox promotoru

Podle předkládaného vynálezu chimérický gen bude obsahovat rostlinný protox promotor. Výběr specifického protox promotoru použitého v chimérickém genu je v rukách každého jednotlivého odborníka, ačkoliv obecně výhodný je promotor z rostlinného druhu blízce příbuzného či

nejvýhodněji identického s druhem, který má obsahovat výsledný chimérický gen. Tak např. pokud je cílem vložit chimérický gen do kukuřice, je výhodné užít protox promotor z jednoděložné rostliny a nejvýhodnější je protox promotor z kukuřice.

II. Terminátory transkripce

Mnoho různých terminátorů je k dispozici pro použití v expresních kazetách. Terminátory zodpovídají za ukončení transkripce za transgenem a jeho správnou polyadenylaci. Vhodné terminátory transkripce jsou takové, o kterých je známo, že fungují v rostlinách a patří mezi ně např. CaMV 35S terminátor, *tml* terminátor, terminátor nopalinsyntázy, terminátor E9 genu *rbcS* z hrachu a také terminátory přirozeně se vyskytující ve spojení s protox genem (tj. protox terminátory). Ty se mohou použít jak v jednoděložných tak i ve dvouděložných rostlinách.

III. Sekvence pro zvýšení nebo regulaci exprese

Byly nalezeny mnohé sekvence zvyšující genovou expresi transkripční jednotky a tyto sekvence se mohou užít ve spojení s geny podle předkládaného vynálezu pro zvýšení jejich exprese v transgenních rostlinách.

Bylo ukázáno, že různé sekvence intronů zvyšují expresi, zvláště v buňkách jednoděložných rostlin. Např. introny genu *Adhl* z kukuřice významně zvyšují expresi divokého typu genu s příbuzným promotorem, pokud jsou vloženy do buněk kukuřice. Zejména intron 1 se ukázal zvláště účinný a zvyšoval expresi v konstruktech s genem chloramfennikolacetyltransferázy (Callis et al., Genes Develop. 1: 1183-1200, 1987). V témže pokusném systému intron z genu *bronzel* kukuřice měl podobný účinek na zvýšení exprese (Callis et al., viz výše).

Intronové sekvence se rutinně vkládají do vektorů pro transformaci rostlin, většinou s netranslatovanou vedoucí sekvencí.

Také mnohé netranslatované vedoucí sekvence odvozené z virů zvyšují expresi, a jsou zvláště účinné ve dvouděložných rostlinách. Vedoucí sekvence viru mozaiky tabáku (TMV, „W-sekvence“), viru chlorotické skvrnitosti kukuřice (MCMV) a viru mozaiky vojtěšky (AMV) jsou účinné ve zvýšení exprese (např. Gallie et al., Nucl Acids Res. 15: 8696-8711, 1987, Skuzeski et al., Plant Mol. Biol. 15: 65-79, 1990).

IV. Cílení genového produktu v buňce

V rostlinách existují různé mechanismy cílení („targeting“) genových produktů a některé sekvence kontrolující fungování těchto mechanismů byly do jisté míry popsány. Např. cílení genových produktů do chloroplastu je řízeno signální sekvencí nalezenou na N-konci proteinu, která je odštěpena během importu do chloroplastu, čímž vniká maturovaný protein (např. Comai et al., J. Biol. Chem. 263: 15104-15109, 1988). Takové signální sekvence se mohou spojit s heterologními genovými produkty a import heterologních produktů se tak nasměruje do chloroplastů (van den Broeck et al., Nature 313: 358-363, 1985). DNA kódující vhodné signální sekvence může být izolována z 5'-konců cDNA kódujících proteiny RUBISCO, CAB, EPSP syntázu, GS2 a mnoho dalších proteinů o kterých je známo, že jsou lokalizovány v chloroplastu.

Jiné genové produkty jsou lokalizovány v jiných organelách jako např. mitochondriích a peroxisomech (např. Unger et al., Plant Mol. Biol. 13: 411-418, 1989). cDNA kódující tyto produkty může být také změněna tak, že se

ovlivní cílení heterologních produktů do těchto organel. Příklady takových sekvencí jsou jádrem kódované ATPázy a pro mitochondrie specifické isoformy aspartátaminotransferázy. Cílení do buněčných proteinových tělísek bylo popsáno Rogersem et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6512-6516, 1985).

Kromě toho byly charakterizovány sekvence, které způsobují cílení genových produktů do jiných buněčných kompartmentů. Aminokoncové sekvence jsou zodpovědné za cílení do ER, apoplastu, a extracelulární sekreci z aleuronových buněk, jak popsali Koehler a Ho (Plant Cell 2: 769-783, 1990). Navíc, aminokoncové sekvence společně s karboxykoncovými sekvencemi jsou zodpovědné za cílení genových produktů do vakuoly (Shishi et al., Plant Mol. Biol. 14: 357-368, 1990).

Spojením vhodné cílové sekvence popsané výše se sekvencí požadovaného transgenu je možné nasměrovat produkt transgenu do jakékoliv organely nebo buněčného kompartmentu. Pro cílení do chloroplastu se např. chloroplastová signální sekvence z genu RUBISCO, CAB, EPSP syntázy nebo GS2, spojí do čtecího rámce s aminokoncovou ATG transgenu. Vybraná signální sekvence by měla obsahovat známá štěpná místa a konstruovaný fúzovaný gen musí zahrnovat všechny aminokyseliny, následující po štěpném místě, které je vyžadováno pro štěpení. V některých případech tomuto požadavku lze vyhovět tím, že se přidá malý počet aminokyselin nezi štěpné místo a ATG transgenu nebo se nahradí některé aminokyseliny v sekvenci transgenu. Konstrukty pro import do chloroplastu se mohou testovat na účinnost příjmu chloroplasty pomocí *in vitro* translace *in vitro* transkribovaného konstruktu následované *in vitro* příjmem do chloroplastu metodou popsanou Bartelettem et al. (In: Edelman et al. (eds.) Methods in

Chloroplast Molecular Biology, Elsevier, s. 1081-1091, 1982) a Wasmann et al. (Mol. Gen. Genet. 205: 446-453, 1986). Tyto konstrukční techniky jsou v oboru dobře známy a dají se shodně použít pro mitochondrie i peroxisomy. Výběr toho, jak cílit expresi transgenu závisí na buněčné lokalizaci prekursoru, který je nutný jako výchozí bod příslušné metabolické dráhy. Cílení bude obvykle do cytosolu nebo chloroplastu, ačkoliv v určitých případech může být do mitochondrie nebo peroxisomu. Produkkt transgenní exprese normálně nevyžaduje žádné cílení do ER, apoplastu nebo vakuoly.

Výše popsané mechanismy buněčného cílení se mohou užít ve spojení s rostlinnými protox promotory tak, aby se ovlivnilo specifické cílení genu, jehož transkripce je řízena promotorem, jehož vzorec exprese je odlišný od promotoru, z kterého byl odvozen cílový signál.

Příklad 7

Transformace jednoděložných rostlin

Techniky transformace jednoděložných rostlin jsou v oboru dobře známy a patří k nim techniky založené na *Agrobacterium tumefaciens* i techniky, které *Agrobacterium* nevyžadují. K technikám bez *Agrobacterium* patří příjem exogenního genetického materiálu přímo protoplasty nebo buňkami. Toho lze dosáhnout pomocí PEG nebo elektroporací zprostředkovaného příjmu, bombardováním mikročásticemi nebo mikroinjekcemi. Příklady těchto technik popsali Paszkowski et al. (EMBO J. 3: 2717-2711, 1984), Potrykus et al. (Mol. Gen. Genet. 199: 169-177, 1985), Reich et al. (Biotechnology 4: 1001-1004, 1986) a Klein et al. (Nature 327: 70-73, 1987). V každém takovém případě byly celé rostliny regenerovány

z transformovaných buněk užitím standardních technik známých v oboru.

Transformace zprostředkovaná pomocí *Agrobacterium* je výhodná technika transformace dvouděložných rostlin vzhledem k vysoké účinnosti transformace a možnosti využít ji pro široké spektrum různých druhů. Mezi mnohé druhy rutinně transformovatelné *Agrobacterium* patří tabák, rajče (EP 0 249 432, Calgene), slunečnice, bavlník (EP 0 317 511), řepka (WO 87/07299, *Brassica*, Calgene), brambor, soja, vojtěška a topol (US 4 795 855).

Transformace cílového rostlinného druhu rekombinantním *Agrobacterium* většinou zahrnuje ko-kultivaci *Agrobacterium* s explantáty z rostlin podle protokolů, které jsou v oboru dobře známy. Transformované pletivo, nesoucí marker rezistence k antibiotiku nebo herbicidu mezi hranicemi T-DNA binárního vektoru, se pak regeneruje na selekčním médiu.

Příklad 8

Transformace jednoděložných rostlin

Transformace většiny druhů jednoděložných rostlin se dnes stala také rutinní technikou. Výhodná technika zahrnuje přímý transfer genů do protoplastů užitím PEG nebo elektroporační techniky, nebo bombardování kalusového pletiva mikročásticemi. Transformace se může provést s jedním druhem DNA nebo více druhy DNA (tj. ko-transformace) a oba způsoby jsou vhodné pro použití v tomto vynálezu. Ko-transformace může být výhodná v tom, že není třeba konstruovat komplexní vektor, a že vznikají transgenní rostliny, kde lokusy transgenu a selektovatelného markerového genu nejsou ve vazbě, což umožňuje v další generaci odstranit selektovatelný marker, pokud je to žádoucí. Avšak nevýhodou ko-transformace je frekvence menší než 100% se kterou se jednotlivé druhy DNA

integrují do genomu (Schocher et al., Biotechnology 4: 1093-1096).

Patentové přihlášky EP 0 292 435 (Ciba-Geigy), EP 0 392 225 (Ciba-Geigy), WO 93/07278 (Ciba-Geigy) a Patent U.S. 5 3560 689 (Ciba-Geigy) popisují upůsoby přípravy kalusu a protoplastů z elitní inbrední linie kukuřice, transformaci protoplastů pomocí PEG nebo elektroporací a regeneraci rostlin kukuřice z transformovaných protoplastů. Gordon-Kamm et al. (Plant Cell 2: 603-618) a Fromm et al. (Biotechnology 8: 833-839, 1990) popsali techniky transformace linie kukuřice odvozené z Al88 metodou bombardování mikročásticemi. Také Mezinárodní patentová přihláška WO 93/07278 (Ciba-Geigy) a Koziel et al. (Biotechnology 11: 194-200, 1993) popisují transformaci elitní linie kukuřice bombardováním mikročásticemi. Při tomto způsobu transformace se užívají nezralá embrya kukuřice o délce 1,5 až 2,5 mm vyříznutá z kukuřičného klasu 14 až 15 dní po opylení a pro vlastní bombardování se užívá zařízení PDS-1000He Biolistics.

Transformace rýže se může provést také technikou přímého přenosu genů s využitím protoplastů nebo bombardování mikročásticemi. Transformace prostřednictvím protoplastů byla popsána jak pro rýži typu *Japonica* tak i typu *Indica* (Zhang et al., Plant Cell REp. 7: 379-384, 1988, Shimamoto et al., Nature 338: 274-277, 1989, Datta et al., Biotechnology 8: 736-740, 1990). Oba typy jsou také rutinně transformovatelné metodou bombardování mikročásticemi (Christou et al., Biotechnology 9: 957-962, 1991).

Patentová přihláška EP 0 332 581 (Ciba-Geigy) popisuje způsob vytvoření, transformaci a regeneraci protoplastů z trav skupiny *Pooideae*. Tento způsob umožňuje transformovat pšenici a travu *Dactylis sp.* Kromě toho byla popsána transformace pšenice metodou bombardování mikročásticemi

buněk dlouhodobě regenerovatelného kalusu typu C (Vasil et al., Biotechnology 10: 667-674, 1992) a nebo metodou bombardování mikročasticemi nezralých embryí a kalusu odvozeného z nezralých embryí (Vasil et al., Biotechnology 11: 1553-1558, 1993, Weeks et al., Plant Physiol. 102: 1077-1084, 1993). Výhodný způsob transformace pšenice však zahrnuje transformaci pšenice bombardováním nezralých embryí mikročasticemi a také zahrnuje krok s použitím vysoké koncentrace sacharózy nebo maltózy před vlastním přenosem genů. Před bombardováním mikročasticemi se libovolný počet embryí (délky 0,75 až 1,00 mm) vyseje na misku s MS médiem obsahujícím 3% sacharózu (Murashige a Skoog, Physiologia Plantarum 15: 473-497, 1962) a 3 mg/l 2,4-D pro indukci somatických embryí, a ponechají se ve tmě. V den kdy má dojít k bombardování mikročasticemi se embrya odstraní z indukčního média a umístí se na osmotikum (tj. indukční médium se zvýšenou koncentrací sacharózy nebo maltózy, typicky až na 15 %). Ponechá se proběhnout plazmolýza embryí po dobu 2 až 3 hodin a pak se embrya podrobí bombardování mikročasticemi. Typické je 20 embryí na jedné cílové destičce, ale tato hodnota není kritická. Vhodný plazmid nesoucí požadovaný gen (např. pCIB3064 nebo pSG35) se nechá precipitovat na zlatých mikročasticích velikosti řádově mikrometru standardním postupem. Každá cílová destička s embryi je odtsřelována pomocí heliového zařízení Biolistics firmy DuPont použitím tlaku přibližně 1000 psi a standardní síťky kalibru 80. Po bombardování se umístí embrya na 24 hodin do tmy (stále na osmotiku), aby se vzpamatovala. Po 24 hodinách se embrya přemístí zpět na indukční médium, kde zůstanou asi měsíc než začne regenerace. Přibližně po měsíci se explantáty embryí s vyvíjejícím se embryonálním kalusem přemístí na regenerační médium (MS + 1 mg/l NAA, 5 mg/l GA) navíc obsahující selekční

agens (10 mg/l basta v případě plazmidu pCIB3064 a 2 mg/l methotrexatu v případě pSOG35). Přibližně po dalším měsíci se vyvíjející výhonky prýtu přemístí do větších sterilních nádob známých jako „GA7“ obsahujících MS poloviční koncentrace, 2% sacharózu a stejnou koncentraci selekčního agens. Mezinárodní patentová přihláška WO 94/138 22 popisuje způsob transformace pšenice a tímto se zde na ni odkazujeme.

Příklad 9

Konstrukce rostlinného transformačního vektoru, který exprimuje změněný Protox-1 gen za nativním Protox-1 promotorem

Fragment genomové DNA z kukuřice o délce 3848 bp (sekvence i. č. 14) se vyjme z izolovaného klonu fága lambda pomocí částečného štěpení SalI-KpnI a liguje se s KpnI-NotI fragmentem odvozeným ze změněné Protox-1 cDNA z kukuřice, který obsahuje záměnu alaninu za leucin v aminokyselině 164 (sekvence i. č. 6). Tak se vytvoří spojení nativního Protox-1 promotoru z kukuřice s cDNA plné délky, která poskytuje, jak bylo ukázáno, toleranci k herbicidu v bakteriálním systému (viz současně podaná Mezinárodní patentová přihláška „Molekuly DNA kódující rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu a její mutanty rezistentní k inhibitoru“, č.PH/5-20757/P1/CGC1847, příklady 8 až 13). Tento fúzovaný produkt je klonován do vektoru odvozeného z plazmidu pUC18 obsahujícího CaMV 35S terminátorovou sekvenci, čímž se vytvoří kazeta „protox promotor/změněná protox cDNA/terminátor“. Plazmid obsahující tuto kazetu byl nazván pWCo-1.

Druhý konstrukt pro transformaci kukuřice je vytvořen vložením prvního intronu nalezeného v kódující sekvenci v kukuřičném genomovém klonu zpět do cDNA kukuřice. Vložení

je provedeno standardním způsobem pomocí PCR fúze s přesahy. Intron (sekvence i. č. 25) je dlouhý 93 bp a je vložen mezi nukleotidy 203 a 204 sekvence i. č. 5, zcela shodně s tím, jak je v přirozeném kontextu v klonu lambda popsán v příkladu 4. Tato verze expresní kazety obsahující intron byla nazvána pWCo-2.

Příklad 10

Demonstrace aktivity Protox-1 promotoru kukuřice v transgenních rostlinách kukuřice

Rostliny kukuřice transformované kazetou „protox“ promotor kukuřice/změněný protox“ byly identifikovány analýzou PCR s primery specifickými pro transgen. Celková RNA byla připravena z rostlin pozitivních v PCR a byla reverzně transkribována pomocí soupravy Superscript M-MLV (Life Technologies) za doporučených podmínek. 2 µl reakční směsi z reverzní transkripce byly použity pro reakci PCR specifickou pro změněnou protox sekvenci. Zatímco netransformované kontroly neposkytly v této reakci žádný produkt, přibližně 85 % rostlin transformovaných pWCo-1 poskytlo pozitivní výsledky, což ukazuje na přítomnost mRNA pocházející z transgenu. To demonstruje jistou úroveň aktivity protox promotoru kukuřice. RNA z transgenních rostlin kukuřice se také analyzovala standardním northernovým přenosem s radioaktivně značenou sondou, což byl fragment protox cDNA kukuřice (sekvence i. č. 5). V některých transgenních rostlinách byla zjištěna vyšší hladina Protox-1 mRNA než v netransformovaných kontrolách. Lze se domnívat, že tato zvýšená hladina mRNA je důsledkem exprese změněné protox-1 mRNA z klonovaného protox promotoru kukuřice.

Příklad 11

Izolace Protox-1 promotorové sekvence z řepy cukrovky

Genomová knihovna ve vektoru Lambda Fix II z řepy cukrovky byla připravena firmou Stratagene. Přibližně 300 000 pfu bylo vyseto a testováno pomocí sondy Protox-1 cDNA z řepy cukrovky (sekvence i. č. 17) stejně jak je popsáno v příkladu 4. Pomocí restriktivního štěpení, hybridizace a analýzy sekvence DNA byl identifikován lambda klon obsahující 7kb úsek genomické DNA řepy cukrovky lokalizovaný od 5' konce kódující sekvence již dříve izolované jako cDNA klon. PstI-SalI fragment dlouhý 2606 bp byl subklonován z lambda klonu do vektoru pBluescript. Tento fragment obsahuje 2068 bp dlouhý úsek 5'-nekódující sekvence a obsahuje také protox-1 promotorovou sekvenci. Obsahuje také prvních 453 bp z protox-1 kódující sekvence a 85 bp z intronu obsaženého v kódující sekvenci. Sekvence tohoto fragmentu je zde uvedena jako sekvence i. č. 26.

Plazmid obsahující sekvenci i. č. 26 byl uložen 6. prosince 1996 jako pWDC-20 (NRRL č. B-21650).

Příklad 12

Konstrukce rostlinného transformačního vektoru, který exprimuje změněný Protox-1 gen z řepy cukrovky za nativním protox-1 promotorem z řepy cukrovky

Fragment genomové DNA řepy cukrovky (sekvence i. č. 26) byl vyjmut z genomového subklonu popsaného v příkladu 11 jako SacI-BsrGI fragment obsahující 2068 bp z 5'-nekódující sekvence a prvních 300 bp Protox-1 kódující sekvence z řepy cukrovky. Tento fragment byl ligován s BsrGI-NotI fragmentem pocházejícím ze změněné Protox-1 cDNA, která obsahuje záměnu tyrosinu za methionin v aminokyselině 449 (sekvence i.č. 18). Tím je vytvořena fúze nativního protox-1 promotoru řepy

cukrovky s cDNA plné délky, která poskytuje toleranci k herbicidu v bakteriálním systému (viz současně podaná Mezinárodní patentová přihláška „Molekuly DNA kódující rostlinnou protoporfyrinogenoxidázu a její mutanty rezistentní k inhibitoru“, č. PH/5-20757/P1/CGC1847). Tento fúzovaný produkt byl klonován do vektoru odvozeného z pUC18 obsahujícího CaMV 35S terminátorovou sekvenci, a tím se vytvořila kazeta „protox promotor/změněná protox cDNA/terminátor“. Plazmid obsahující tuto kazetu byl nazván pWCo-3.

Příklad 13

Příprava k herbicidu tolerantních rostlin exprimujících fúzovaný gen „nativní Protox-1 promotor z řepy cukrovky/změněný Protox-1 z řepy cukrovky“

Expresní kazeta z pWCo-3 se transformuje do rostlin řepy cukrovky kterýmkoliv způsobem transformace vhodným pro dvouděložná rostliny, včetně použití *Agrobacterium*, protoplastů nebo bombardování mikročásticemi. Transgenní rostliny exprimující změněný protox-1 enzym se identifikují pomocí RNA-PCR a testují se na toleranci k protox-inhibujícím herbicidům v koncentracích, které jsou letální pro netransformované rostliny řepy cukrovky.

Předkládaný vynález byl popsán vzhledem ke specifickému provedení vynálezu, ale různé variace a modifikace provedení jsou možné a také tyto variace, modifikace a různá provedení je třeba považovat za součást předkládaného vynálezu.

20

AAT GTT TAT AAG CCT CTT AGA CTC CGT TGT TCA GTG GCC GGT GGACCA	150
Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro	
25 30 35 40	
ACC GTC GGA TCT TCA AAA ATC GAA GGC GGA GGA GGC ACC ACC ATC ACG	198
Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr	
45 50 55	
ACG GAT TGT GTG ATT GTC GGC GGA GGT ATT AGT GGT CTT TGC ATC GCT	246
Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala	
60 65 70	
CAG GCG CTT GCT ACT AAG CAT CCT GAT GCT GCT CCG AAT TTA ATT GTG	294
Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val	
75 80 85	
ACC GAG GCT AAG GAT CGT GTT GGA GGC AAC ATT ATC ACT CGT GAA GAG	342
Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu	
90 95 100	
AAT GGT TTT CTC TGG GAA GAA GGT CCC AAT AGT TTT CAA CCG TCT GAT	390
Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp	
105 110 115 120	
CCT ATG CTC ACT ATG GTG GTA GAT AGT GGT TTG AAG GAT GAT TTG GTG	438
Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val	
125 130 135	
TTG GGA GAT CCT ACT GCG CCA AGG TTT GTG TTG TGG AAT GGG AAA TTG	486
Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu	
140 145 150	
AGG CCG GTT CCA TCG AAG CTA ACA GAC TTA CCG TTC TTT GAT TTG ATG	534
Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met	
155 160 165	
AGT ATT GGT GGG AAG ATT AGA GCT GGT TTT GGT GCA CTT GGC ATT CGA	582
Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg	
170 175 180	
CCG TCA CCT CCA GGT CGT GAA GAA TCT GTG GAG GAG TTT GTA CCG CGT	630
Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg	
185 190 195 200	

AAC CTC GGT GAT GAG GTT TTT GAG CGC CTG ATT GAA CCG TTT TGT TCA Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser	678
205 210 215	
GGT GTT TAT GCT GGT GAT CCT TCA AAA CTG AGC ATG AAA GCA GCG TTT Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe	726
220 225 230	
GGG AAG GTT TGG AAA CTA GAG CAA AAT GGT GGA AGC ATA ATA GGT GGT Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly	774
235 240 245	
ACT TTT AAG GCA ATT CAG GAG AGG AAA AAC GCT CCC AAG GCA GAA CGA Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg	822
250 255 260	
GAC CCG CGC CTG CCA AAA CCA CAG GGC CAA ACA GTT GGT TCT TTC AGG Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg	870
265 270 275 280	
AAG GGA CTT CGA ATG TTG CCA GAA GCA ATA TCT GCA AGA TTA GGT AGC Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser	918
285 290 295	
AAA GTT AAG TTG TCT TGG AAG CTC TCA GGT ATC ACT AAG CTG GAG AGC Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser	966
300 305 310	
GGA GGA TAC AAC TTA ACA TAT GAG ACT CCA GAT GGT TTA GTT TCC GTG Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val	1014
315 320 325	
CAG AGC AAA AGT GTT GTA ATG ACG GTG CCA TCT CAT GTT GCA AGT GGT Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly	1062
330 335 340	
CTC TTG CGC CCT CTT TCT GAA TCT GCT GCA AAT GCA CTC TCA AAA CTA Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu	1110
345 350 355 360	
TAT TAC CCA CCA GTT GCA GCA GTA TCT ATC TCG TAC CCG AAA GAA GCA Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala	1158
365 370 375	
ATC CGA ACA GAA TGT TTG ATA GAT GGT GAA CTA AAG GGT TTT GGG CAA	1206

25.08.98

- 50 -

Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln	
380	385 390
TTG CAT CCA CGC ACG CAA GGA GTT GAA ACA TTA GGA ACT ATC TAC AGC	1254
Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser	
395	400 405
TCC TCA CTC TTT CCA AAT CGC GCA CCG CCC GGA AGA ATT TTG CTG TTG	1302
Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu	
410	415 420
AAC TAC ATT GGC GGG TCT ACA AAC ACC GGA ATT CTG TCC AAG TCT GAA	1350
Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu	
425	430 435 440
GGT GAG TTA GTG GAA GCA GTT GAC AGA GAT TTG AGG AAA ATG CTA ATT	1398
Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile	
445	450 455
AAG CCT AAT TCG ACC GAT CCA CTT AAA TTA GGA GTT AGG GTA TGG CCT	1446
Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro	
460	465 470
CAA GCC ATT CCT CAG TTT CTA GTT GGT CAC TTT GAT ATC CTT GAC ACG	1494
Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr	
475	480 485
GCT AAA TCA TCT CTA ACG TCT TCG GGC TAC GAA GGG CTA TTT TTG GGT	1542
Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly	
490	495 500
GGC AAT TAC GTC GCT GGT GTA GCC TTA GGC CGG TGT GTA GAA GGC GCA	1590
Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala	
505	510 515 520
TAT GAA ACC GCG ATT GAG GTC AAC AAC TTC ATG TCA CGG TAC GCT TAC	1638
Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr	
525	530 535
AAG TAAATGTAAA ACATTAAATC TCCCAGCTTG CGTGAGTTTT ATTAAATATT	1691
Lys	
TTGAGATATC CAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1719

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 537 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser
 1 5 10 15

Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu
 20 25 30

Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly
 50 55 60

Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly
 85 90 95

Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly
 100 105 110

Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp
 115 120 125

Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg
 130 135 140

Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr
 145 150 155 160

Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala
 165 170 175

28.08.98

-52 -

Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu
180 185 190

Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu
195 200 205

Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser
210 215 220

Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln
225 230 235 240

Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg
245 250 255

Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln
260 265 270

Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu
275 280 285

Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu
290 295 300

Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu
305 310 315 320

Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr
325 330 335

Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser
340 345 350

Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val
355 360 365

Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
370 375 380

Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
385 390 395 400

Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
405 410 415

- 53 -

Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn
 420 425 430
 Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp
 435 440 445
 Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu
 450 455 460
 Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val
 465 470 475 480
 Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser
 485 490 495
 Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala
 500 505 510
 Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn
 515 520 525
 Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 1738 párů bazí
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: cDNA
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) ANTI-SENSE: ne
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: *Arabidopsis thaliana*
- (vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:
 - (B) KLON: pWDC-1 (NRRL B-21237)

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS

(B) POZICE: 70..1596

(C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „protox-2 z
Arabidopsis“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

TTTTTTACTT ATTTCCGTCA CTGCTTTCTGA CTGGTCAGAG ATTTTGACTC TGAATTGTTG	60
CAGATAGCA ATG GCG TCT GGA GCA GTA GCA GAT CAT CAA ATT GAA GCG	108
Met Ala Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala	
1 5 10	
GTT TCA GGA AAA AGA GTC GCA GTC GTA GGT GCA GGT GTA AGT GGA CTT	156
Val Ser Gly Lys Arg Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu	
15 20 25	
GCG GCG GCT TAC AAG TTG AAA TCG AGG GGT TTG AAT GTG ACT GTG TTT	204
Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe	
30 35 40 45	
GAA GCT GAT GGA AGA GTA GGT GGG AAG TTG AGA AGT GTT ATG CAA AAT	252
Glu Ala Asp Gly Arg Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn	
50 55 60	
GGT TTG ATT TGG GAT GAA GGA GCA AAC ACC ATG ACT GAG GCT GAG CCA	300
Gly Leu Ile Trp Asp Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro	
65 70 75	
GAA GTT GGG AGT TTA CTT GAT GAT CTT GGG CTT CGT GAG AAA CAA CAA	348
Glu Val Gly Ser Leu Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln	
80 85 90	
TTT CCA ATT TCA CAG AAA AAG CGG TAT ATT GTG CGG AAT GGT GTA CCT	396
Phe Pro Ile Ser Gln Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro	
95 100 105	
GTG ATG CTA CCT ACC AAT CCC ATA GAG CTG GTC ACA AGT AGT GTG CTC	444
Val Met Leu Pro Thr Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu	
110 115 120 125	
TCT ACC CAA TCT AAG TTT CAA ATC TTG TTG GAA CCA TTT TTA TGG AAG	492
Ser Thr Gln Ser Lys Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys	
130 135 140	

25.08.98

- 55 -

AAA AAG TCC TCA AAA GTC TCA GAT GCA TCT GCT GAA GAA AGT GTA AGC Lys Lys Ser Ser Lys Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser	540
145 150 155	
GAG TTC TTT CAA CGC CAT TTT GGA CAA GAG GTT GTT GAC TAT CTC ATC Glu Phe Phe Gln Arg His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile	588
160 165 170	
GAC CCT TTT GTT GGT GGA ACA AGT GCT GCG GAC CCT GAT TCC CTT TCA Asp Pro Phe Val Gly Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser	636
175 180 185	
ATG AAG CAT TCT TTC CCA GAT CTC TGG AAT GTA GAG AAA AGT TTT GGC Met Lys His Ser Phe Pro Asp Leu Trp Asn Val Glu Lys Ser Phe Gly	684
190 195 200 205	
TCT ATT ATA GTC GGT GCA ATC AGA ACA AAG TTT GCT GCT AAA GGT GGT Ser Ile Ile Val Gly Ala Ile Arg Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly	732
210 215 220	
AAA AGT AGA GAC ACA AAG AGT TCT CCT GGC ACA AAA AAG GGT TCG CGT Lys Ser Arg Asp Thr Lys Ser Ser Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg	780
225 230 235	
GGG TCA TTC TCT TTT AAG GGG GGA ATG CAG ATT CTT CCT GAT ACG TTG Gly Ser Phe Ser Phe Lys Gly Gly Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu	828
240 245 250	
TGC AAA AGT CTC TCA CAT GAT GAG ATC AAT TTA GAC TCC AAG GTA CTC Cys Lys Ser Leu Ser His Asp Glu Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu	876
255 260 265	
TCT TTG TCT TAC AAT TCT GGA TCA AGA CAG GAG AAC TGG TCA TTA TCT Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Gly Ser Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser	924
270 275 280 285	
TGT GTT TCG CAT AAT GAA ACG CAG AGA CAA AAC CCC CAT TAT GAT GCT Cys Val Ser His Asn Glu Thr Gln Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala	972
290 295 300	
GTA ATT ATG ACG GCT CCT CTG TGC AAT GTG AAG GAG ATG AAG GTT ATG Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu Met Lys Val Met	1020
305 310 315	

25.08.98

- 56 -

AAA GGA GGA CAA CCC TTT CAG CTA AAC TTT CTC CCC GAG ATT AAT TAC 1068
Lys Gly Gly Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro Glu Ile Asn Tyr
320 325 330

ATG CCC CTC TCG GTT TTA ATC ACC ACA TTC ACA AAG GAG AAA GTA AAG 1116
Met Pro Leu Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys Glu Lys Val Lys
335 340 345

AGA CCT CTT GAA GGC TTT GGG GTA CTC ATT CCA TCT AAG GAG CAA AAG 1164
Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln Lys
350 355 360 365

CAT GGT TTC AAA ACT CTA GGT ACA CTT TTT TCA TCA ATG ATG TTT CCA 1212
His Gly Phe Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro
370 375 380

GAT CGT TCC CCT AGT GAC GTT CAT CTA TAT ACA ACT TTT ATT GGT GGG 1260
Asp Arg Ser Pro Ser Asp Val His Leu Tyr Thr Thr Phe Ile Gly Gly
385 390 395

AGT AGG AAC CAG GAA CTA GCC AAA GCT TCC ACT GAC GAA TTA AAA CAA 1308
Ser Arg Asn Gln Glu Leu Ala Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln
400 405 410

GTT GTG ACT TCT GAC CTT CAG CGA CTG TTG GGG GTT GAA GGT GAA CCC 1356
Val Val Thr Ser Asp Leu Gln Arg Leu Leu Gly Val Glu Gly Glu Pro
415 420 425

GTG TCT GTC AAC CAT TAC TAT TGG AGG AAA GCA TTC CCG TTG TAT GAC 1404
Val Ser Val Asn His Tyr Tyr Trp Arg Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Asp
430 435 440 445

AGC AGC TAT GAC TCA GTC ATG GAA GCA ATT GAC AAG ATG GAG AAT GAT 1452
Ser Ser Tyr Asp Ser Val Met Glu Ala Ile Asp Lys Met Glu Asn Asp
450 455 460

CTA CCT GGG TTC TTC TAT GCA GGT AAT CAT CGA GGG GGG CTC TCT GTT 1500
Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly Gly Leu Ser Val
465 470 475

GGG AAA TCA ATA GCA TCA GGT TGC AAA GCA GCT GAC CTT GTG ATC TCA 1548
Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gly Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser
480 485 490

25.08.98

- 57 -

TAC CTG GAG TCT TGC TCA AAT GAC AAG AAA CCA AAT GAC AGC TTA TAACATTGTC
1603

Tyr Leu Glu Ser Cys Ser Asn Asp Lys Lys Pro Asn Asp Ser Leu
495 500 505

AAGGTTTCGTC CCTTTTATC ACTTACTTTG TAAACTTGTA AAATGCAACA AGCCGCCGTG 1663

CGATTAGCCA ACAACTCAGC AAAACCCAGA TTCTCATAAG GCTCACTAAT TCCAGAATAA 1723

ACTATTTATG TAAAA 1738

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 508 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

Met Ala Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala Val Ser Gly
1 5 10 15

Lys Arg Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala
20 25 30

Tyr Lys Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Asp
35 40 45

Gly Arg Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn Gly Leu Ile
50 55 60

Trp Asp Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro Glu Val Gly
65 70 75 80

Ser Leu Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln Phe Pro Ile
85 90 95

Ser Gln Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro Val Met Leu
100 105 110

Pro Thr Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu Ser Thr Gln

25.08.98

- 58 -

115	120	125
Ser Lys Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys Lys Lys Ser		
130	135	140
Ser Lys Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser Glu Phe Phe		
145	150	155 160
Gln Arg His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe		
165	170	175
Val Gly Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser Met Lys His		
180	185	190
Ser Phe Pro Asp Leu Trp Asn Val Glu Lys Ser Phe Gly Ser Ile Ile		
195	200	205
Val Gly Ala Ile Arg Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly Lys Ser Arg		
210	215	220
Asp Thr Lys Ser Ser Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg Gly Ser Phe		
225	230	235 240
Ser Phe Lys Gly Gly Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu Cys Lys Ser		
245	250	255
Leu Ser His Asp Glu Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu Ser Leu Ser		
260	265	270
Tyr Asn Ser Gly Ser Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser Cys Val Ser		
275	280	285
His Asn Glu Thr Gln Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala Val Ile Met		
290	295	300
Thr Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu Met Lys Val Met Lys Gly Gly		
305	310	315 320
Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro Glu Ile Asn Tyr Met Pro Leu		
325	330	335
Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys Glu Lys Val Lys Arg Pro Leu		
340	345	350
Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln Lys His Gly Phe		

355	360	365
Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ser		
370	375	380
Pro Ser Asp Val His Leu Tyr Thr Thr Phe Ile Gly Gly Ser Arg Asn		
385	390	395 400
Gln Glu Leu Ala Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Val Val Thr		
405	410	415
Ser Asp Leu Gln Arg Leu Leu Gly Val Glu Gly Glu Pro Val Ser Val		
420	425	430
Asn His Tyr Tyr Trp Arg Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Asp Ser Ser Tyr		
435	440	445
Asp Ser Val Met Glu Ala Ile Asp Lys Met Glu Asn Asp Leu Pro Gly		
450	455	460
Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ser		
465	470	475 480
Ile Ala Ser Gly Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser Tyr Leu Glu		
485	490	495
Ser Cys Ser Asn Asp Lys Lys Pro Asn Asp Ser Leu		
500	505	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1691 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: *Zea mays* (kukuřice)

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

(B) KLON: pWDC-4 (NRRL B-21260)

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS

(B) POZICE: 1..1443

(C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „cDNA protox-1
z kukuřice“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

GCG GAC TGC GTC GTG GTG GGC GGA GGC ATC AGT GGC CTC TGC ACC GCG	48
Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala	
1 5 10 15	
CAG GCG CTG GCC ACG CGG CAC GGC GTC GGG GAC GTG CTT GTC ACG GAG	96
Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly Asp Val Leu Val Thr Glu	
20 25 30	
GCC CGC GCC CGC CCC GGC GGC AAC ATT ACC ACC GTC GAG CGC CCC GAG	144
Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Glu	
35 40 45	
GAA GGG TAC CTC TGG GAG GAG GGT CCC AAC AGC TTC CAG CCC TCC GAC	192
Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp	
50 55 60	
CCC GTT CTC ACC ATG GCC GTG GAC AGC GGA CTG AAG GAT GAC TTG GTT	240
Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val	
65 70 75 80	
TTT GGG GAC CCA AAC GCG CCG CGT TTC GTG CTG TGG GAG GGG AAG CTG	288
Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu	
85 90 95	
AGG CCC GTG CCA TCC AAG CCC GCC GAC CTC CCG TTC TTC GAT CTC ATG	336
Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met	
100 105 110	
AGC ATC CCA GGG AAG CTC AGG GCC GGT CTA GGC GCG CTT GGC ATC CGC	384
Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg	
115 120 125	

CCG CCT CCT CCA GGC CGC GAA GAG TCA GTG GAG GAG TTC GTG CGC CGC Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg 130 135 140	432
AAC CTC GGT GCT GAG GTC TTT GAG CGC CTC ATT GAG CCT TTC TGC TCA Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser 145 150 155 160	480
GGT GTC TAT GCT GGT GAT CCT TCT AAG CTC AGC ATG AAG GCT GCA TTT Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe 165 170 175	528
GGG AAG GTT TGG CGG TTG GAA GAA ACT GGA GGT AGT ATT ATT GGT GGA Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly 180 185 190	576
ACC ATC AAG ACA ATT CAG GAG AGG AGC AAG AAT CCA AAA CCA CCG AGG Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg 195 200 205	624
GAT GCC CGC CTT CCG AAG CCA AAA GGG CAG ACA GTT GCA TCT TTC AGG Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg 210 215 220	672
AAG GGT CTT GCC ATG CTT CCA AAT GCC ATT ACA TCC AGC TTG GGT AGT Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser 225 230 235 240	720
AAA GTC AAA CTA TCA TGG AAA CTC ACG AGC ATT ACA AAA TCA GAT GAC Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asp 245 250 255	768
AAG GGA TAT GTT TTG GAG TAT GAA ACG CCA GAA GGG GTT GTT TCG GTG Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Val 260 265 270	816
CAG GCT AAA AGT GTT ATC ATG ACT ATT CCA TCA TAT GTT GCT AGC AAC Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn 275 280 285	864
ATT TTG CGT CCA CTT TCA AGC GAT GCT GCA GAT GCT CTA TCA AGA TTC Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Arg Phe 290 295 300	912

- 62 -

TAT TAT CCA CCG GTT GCT GCT GTA ACT GTT TCG TAT CCA AAG GAA GCA Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala 305 310 315 320	960
ATT AGA AAA GAA TGC TTA ATT GAT GGG GAA CTC CAG GGC TTT GGC CAG Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln 325 330 335	1008
TTG CAT CCA CGT AGT CAA GGA GTT GAG ACA TTA GGA ACA ATA TAC AGT Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser 340 345 350	1056
TCC TCA CTC TTT CCA AAT CGT GCT CCT GAC GGT AGG GTG TTA CTT CTA Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp Gly Arg Val Leu Leu Leu 355 360 365	1104
AAC TAC ATA GGA GGT GCT ACA AAC ACA GGA ATT GTT TCC AAG ACT GAA Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu 370 375 380	1152
AGT GAG CTG GTC GAA GCA GTT GAC CGT GAC CTC CGA AAA ATG CTT ATA Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile 385 390 395 400	1200
AAT TCT ACA GCA GTG GAC CCT TTA GTC CTT GGT GTT CGA GTT TGG CCA Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro 405 410 415	1248
CAA GCC ATA CCT CAG TTC CTG GTA GGA CAT CTT GAT CTT CTG GAA GCC Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Glu Ala 420 425 430	1296
GCA AAA GCT GCC CTG GAC CGA GGT GGC TAC GAT GGG CTG TTC CTA GGA Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly 435 440 445	1344
GGG AAC TAT GTT GCA GGA GTT GCC CTG GGC AGA TGC GTT GAG GGC GCG Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala 450 455 460	1392
TAT GAA AGT GCC TCG CAA ATA TCT GAC TTC TTG ACC AAG TAT GCC TAC Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr 465 470 475 480	1440
AAG TGATGAAAGA ACTGGAGCGC TACTTGTTAA TCGTTTATGT TGCATAGATG	1493

25.08.98

- 63 -

Lys

AGGTGCCTCC GGGGAAAAA AAGCTTGAAT AGTATTTTTT ATTCTTATTT TGTAATTC 1553
 ATTTCTGTTC TTTTCTAT CAGTAATTAG TTATATTTTA GTTCTGTAGG AGATTGTTCT 1613
 GTTCACTGCC CTTCAAAAGA AATTTTATTT TTCATTCTTT TATGAGAGCT GTGCTACTTA 1673
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAA 1691

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 481 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala
 1 5 10 15
 Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly Asp Val Leu Val Thr Glu
 20 25 30
 Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Glu
 35 40 45
 Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp
 50 55 60
 Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val
 65 70 75 80
 Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu
 85 90 95
 Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met
 100 105 110
 Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg

25.08.99

- 64 -

115	120	125
Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg		
130	135	140
Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser		
145	150	155 160
Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe		
165	170	175
Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly		
180	185	190
Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg		
195	200	205
Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg		
210	215	220
Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser		
225	230	235 240
Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asp		
245	250	255
Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Val		
260	265	270
Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn		
275	280	285
Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Arg Phe		
290	295	300
Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala		
305	310	315 320
Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln		
325	330	335
Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser		
340	345	350
Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp Gly Arg Val Leu Leu Leu		

- 65 -

355 360 365
 Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu
 370 375 380

 Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile
 385 390 395 400

 Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro
 405 410 415

 Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Glu Ala
 420 425 430

 Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly
 435 440 445

 Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala
 450 455 460

 Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr
 465 470 475 480

 Lys

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 - (A) DÉLKA: 2061 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: cDNA
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) ANTI-SENSE: ne
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
 - (A) ORGANISMUS: *Zea mays* (kukuřice)
- (vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:
 - (B) KLON: pWDC-3 (NRRL B-21259)

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS

(B) POZICE: 64..1698

(C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „protox-2 z kukuřice“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

CTCTCCTACC TCCACCTCCA CGACAACAAG CAAATCCCCA TCCAGTTCCA AACCCCTAACT	60
CAA ATG CTC GCT TTG ACT GCC TCA GCC TCA TCC GCT TCG TCC CAT CCT	108
Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro	
1 5 10 15	
TAT CGC CAC GCC TCC GCG CAC ACT CGT CGC CCC CGC CTA CGT GCG GTC	156
Tyr Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val	
20 25 30	
CTC GCG ATG GCG GGC TCC GAC GAC CCC CGT GCA GCG CCC GCC AGA TCG	204
Leu Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser	
35 40 45	
GTC GCC GTC GTC GGC GCC GGG GTC AGC GGG CTC GCG GCG GCG TAC AGG	252
Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg	
50 55 60	
CTC AGA CAG AGC GGC GTG AAC GTA ACG GTG TTC GAA GCG GCC GAC AGG	300
Leu Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg	
65 70 75	
GCG GGA GGA AAG ATA CGG ACC AAT TCC GAG GGC GGG TTT GTC TGG GAT	348
Ala Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp	
80 85 90 95	
GAA GGA GCT AAC ACC ATG ACA GAA GGT GAA TGG GAG GCC AGT AGA CTG	396
Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu	
100 105 110	
ATT GAT GAT CTT GGT CTA CAA GAC AAA CAG CAG TAT CCT AAC TCC CAA	444
Ile Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln	
115 120 125	
CAC AAG CGT TAC ATT GTC AAA GAT GGA GCA CCA GCA CTG ATT CCT TCG	492
His Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser	

25.05.99

-67-

130	135	140	
GAT CCC ATT TCG CTA ATG AAA AGC AGT GTT CTT TCG ACA AAA TCA AAG			540
Asp Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys			
145	150	155	
ATT GCG TTA TTT TTT GAA CCA TTT CTC TAC AAG AAA GCT AAC ACA AGA			588
Ile Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg			
160	165	170	175
AAC TCT GGA AAA GTG TCT GAG GAG CAC TTG AGT GAG AGT GTT GGG AGC			636
Asn Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser			
180	185	190	
TTC TGT GAA CGC CAC TTT GGA AGA GAA GTT GTT GAC TAT TTT GTT GAT			684
Phe Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp			
195	200	205	
CCA TTT GTA GCT GGA ACA AGT GCA GGA GAT CCA GAG TCA CTA TCT ATT			732
Pro Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile			
210	215	220	
CGT CAT GCA TTC CCA GCA TTG TGG AAT TTG GAA AGA AAG TAT GGT TCA			780
Arg His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser			
225	230	235	
GTT ATT GTT GGT GCC ATC TTG TCT AAG CTA GCA GCT AAA GGT GAT CCA			828
Val Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro			
240	245	250	255
GTA AAG ACA AGA CAT GAT TCA TCA GGG AAA AGA AGG AAT AGA CGA GTG			876
Val Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val			
260	265	270	
TCG TTT TCA TTT CAT GGT GGA ATG CAG TCA CTA ATA AAT GCA CTT CAC			924
Ser Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His			
275	280	285	
AAT GAA GTT GGA GAT GAT AAT GTG AAG CTT GGT ACA GAA GTG TTG TCA			972
Asn Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser			
290	295	300	
TTG GCA TGT ACA TTT GAT GGA GTT CCT GCA CTA GGC AGG TGG TCA ATT			1020
Leu Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile			
305	310	315	

26.08.98

- 69 -

AAG ATG GAG AAA AAC CTT CCA GGG TTC TTC TAC GCA GGA AAT AGC AAG	1596
Lys Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys	
500 505 510	
GAT GGG CTT GCT GTT GGA AGT GTT ATA GCT TCA GGA AGC AAG GCT GCT	1644
Asp Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala	
515 520 525	
GAC CTT GCA ATC TCA TAT CTT GAA TCT CAC ACC AAG CAT AAT AAT TCA	1692
Asp Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser	
530 535 540	
CAT TGAAAGTGTC TGACCTATCC TCTAGCAGTT GTCGACAAAT TTCTCCAGTT	1745
His	
545	
CATGTACAGT AGAAACCGAT GCGTTGCAGT TTCAGAACAT CTTCACTTCT TCAGATATTA	1805
ACCCCTTCGTT GAACATCCAC CAGAAAGGTA GTCACATGTG TAAGTGGGAA AATGAGGTTA	1865
AAAACCTATTA TGGCGGCCGA AATGTTCCCTT TTTGTTTTCC TCACAAGTGG CCTACGACAC	1925
TTGATGTTGG AAATACATTT AAATTTGTTG AATTGTTTGA GAACACATGC GTGACGTGTA	1985
ATATTTGCCT ATTGTGATTT TAGCAGTAGT CTTGGCCAGA TTATGCTTTA CGCCTTTAAA	2045
AAAAAAAAAA AAAAAA	2061

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
- (A) DÉLKA: 544 aminokyselin
 - (B) TYP: aminokyselina
 - (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro Tyr	
1 5 10 15	
Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val Leu	
20 25 30	

25.03.93

- 70 -

Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser Val
 35 40 45

Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Leu
 50 55 60

Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala
 65 70 75 80

Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp Glu
 85 90 95

Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu Ile
 100 105 110

Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His
 115 120 125

Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser Asp
 130 135 140

Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Ile
 145 150 155 160

Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg Asn
 165 170 175

Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe
 180 185 190

Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp Pro
 195 200 205

Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Arg
 210 215 220

His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Val
 225 230 235 240

Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro Val
 245 250 255

Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser
 260 265 270

25.08.99

- 71-

Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn
 275 280 285

Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu
 290 295 300

Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile Ser
 305 310 315 320

Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln Thr
 325 330 335

Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg Met
 340 345 350

Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys
 355 360 365

Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Asp
 370 375 380

Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys
 385 390 395 400

Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser
 405 410 415

Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Thr
 420 425 430

Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ser
 435 440 445

Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly Val
 450 455 460

Glu Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Val Tyr Trp Gly Asn Ala Phe
 465 470 475 480

Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Ser Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu Lys
 485 490 495

Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys Asp
 500 505 510

Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp

515

520

525

Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser His

530

535

540

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1811 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: *Triticum aestivum* (pšenice)

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

- (B) KLON: pWDC-13 (NRRL B-21545)

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 3..1589
- (C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „protox-1 ze pšenice“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

GC GCA ACA ATG GCC ACC GCC ACC GTC GCG GCC GCG TCG CCG CTC CGC 47
 Ala Thr Met Ala Thr Ala Thr Val Ala Ala Ala Ser Pro Leu Arg
 1 5 10 15

GGC AGG GTC ACC GGG CGC CCA CAC CGC GTC CGC CCG CGT TGC GCT ACC 95
 Gly Arg Val Thr Gly Arg Pro His Arg Val Arg Pro Arg Cys Ala Thr
 20 25 30

GCG AGC AGC GCG ACC GAG ACT CCG GCG GCG CCC GGC GTG CGG CTG TCC 143
 Ala Ser Ser Ala Thr Glu Thr Pro Ala Ala Pro Gly Val Arg Leu Ser

35	40	45	
GCG GAA TGC GTC ATT GTG GGC GCC GGC ATC AGC GGC CTC TGC ACC GCG			191
Ala Glu Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala			
50	55	60	
CAG GCG CTG GCC ACC CGA TAC GGC GTC AGC GAC CTG CTC GTC ACG GAG			239
Gln Ala Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Ser Asp Leu Leu Val Thr Glu			
65	70	75	
GCC CGC GAC CGC CCG GGC GGC AAC ATC ACC ACC GTC GAG CGT CCC GAC			287
Ala Arg Asp Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Asp			
80	85	90	95
GAG GGG TAC CTG TGG GAG GAG GGA CCC AAC AGC TTC CAG CCC TCC GAC			335
Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp			
100	105	110	
CCG GTC CTC ACC ATG GCC GTG GAC AGC GGG CTC AAG GAT GAC TTG GTG			383
Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val			
115	120	125	
TTC GGG GAC CCC AAC GCG CCC CGG TTC GTG CTG TGG GAG GGG AAG CTG			431
Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu			
130	135	140	
AGG CCG GTG CCG TCG AAG CCA GGC GAC CTG CCT TTC TTC AGC CTC ATG			479
Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Gly Asp Leu Pro Phe Phe Ser Leu Met			
145	150	155	
AGT ATC CCT GGG AAG CTC AGG GCC GGC CTT GGC GCG CTC GGC ATT CGC			527
Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg			
160	165	170	175
CCA CCT CCT CCA GGG CGC GAG GAG TCG GTG GAG GAG TTT GTG CGC CGC			575
Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg			
180	185	190	
AAC CTC GGT GCC GAG GTC TTT GAG CGC CTC ATC GAG CCT TTC TGC TCA			623
Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser			
195	200	205	
GGT GTA TAT GCT GGT GAT CCT TCG AAG CTT AGT ATG AAG GCT GCA TTT			671
Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe			
210	215	220	

GGG AAG GTC TGG AGG TTG GAG GAG ATT GGA GGT AGT ATT ATT GGT GGA Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ile Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly 225 230 235	719
ACC ATC AAG GCG ATT CAG GAT AAA GGG AAG AAC CCC AAA CCG CCA AGG Thr Ile Lys Ala Ile Gln Asp Lys Gly Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg 240 245 250 255	767
GAT CCC CGA CTT CCG GCA CCA AAG GGA CAG ACG GTG GCA TCT TTC AGG Asp Pro Arg Leu Pro Ala Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg 260 265 270	815
AAG GGT CTA GCC ATG CTC CCG AAT GCC ATC GCA TCT AGG CTG GGT AGT Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Ala Ser Arg Leu Gly Ser 275 280 285	863
AAA GTC AAG CTG TCA TGG AAG CTT ACG AGC ATT ACA AAG GCG GAC AAC Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ala Asp Asn 290 295 300	911
CAA GGA TAT GTA TTA GGT TAT GAA ACA CCA GAA GGA CTT GTT TCA GTG Gln Gly Tyr Val Leu Gly Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Leu Val Ser Val 305 310 315	959
CAG GCT AAA AGT GTT ATC ATG ACC ATC CCG TCA TAT GTT GCT AGT GAT Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp 320 325 330 335	1007
ATC TTG CGC CCA CTT TCA ATT GAT GCA GCA GAT GCA CTC TCA AAA TTC Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ile Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe 340 345 350	1055
TAT TAT CCG CCA GTT GCT GCT GTA ACT GTT TCA TAT CCA AAA GAA GCT Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala 355 360 365	1103
ATT AGA AAA GAA TGC TTA ATT GAT GGG GAG CTC CAG GGT TTC GGC CAG Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln 370 375 380	1151
TTG CAT CCA CGT AGC CAA GGA GTC GAG ACT TTA GGG ACA ATA TAT AGC Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser 385 390 395	1199

TCT TCT CTC TTT CCT AAT CGT GCT CCT GCT GGA AGA GTG TTA CTT CTG	1247
Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu	
400 405 410 415	
AAC TAT ATC GGG GGT TCT ACA AAT ACA GGG ATC GTC TCC AAG ACT GAG	1295
Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu	
420 425 430	
AGT GAC TTA GTA GGA GCC GTT GAC CGT GAC CTC AGA AAA ATG TTG ATA	1343
Ser Asp Leu Val Gly Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile	
435 440 445	
AAC CCT AGA GCA GCA GAC CCT TTA GCA TTA GGG GTT CGA GTG TGG CCA	1391
Asn Pro Arg Ala Ala Asp Pro Leu Ala Leu Gly Val Arg Val Trp Pro	
450 455 460	
CAA GCA ATA CCA CAG TTT TTG ATT GGG CAC CTT GAT CGC CTT GCT GCT	1439
Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His Leu Asp Arg Leu Ala Ala	
465 470 475	
GCA AAA TCT GCA CTG GGC CAA GGC GGC TAC GAC GGG TTG TTC CTA GGA	1487
Ala Lys Ser Ala Leu Gly Gln Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly	
480 485 490 495	
GGA AAC TAC GTC GCA GGA GTT GCC TTG GGC CGA TGC ATC GAG GGT GCG	1535
Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala	
500 505 510	
TAC GAG AGT GCC TCA CAA GTA TCT GAC TTC TTG ACC AAG TAT GCC TAC	1583
Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Val Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr	
515 520 525	
AAG TGA TGGAAGTAGT GCATCTCTTC ATTTTGTTC ATATACGAGG TGAGGCTAGG	1639
Lys	
ATCGGTAAAA CATCATGAGA TTCTGTAGTG TTTCTTTAAT TGAAAAACA AATTTTAGTG	1699
ATGCAATATG TGCTCTTTCC TGTAGTTCGA GCATGTACAT CGGTATGGGA TAAAGTAGAA	1759
TAAGCTATTC TGCAAAGCA GTGATTTTTT TTGAAAAAA AAAAAAAAAA AA	1811

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 528 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

Ala Thr Met Ala Thr Ala Thr Val Ala Ala Ala Ser Pro Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Arg Val Thr Gly Arg Pro His Arg Val Arg Pro Arg Cys Ala Thr Ala
 20 25 30

Ser Ser Ala Thr Glu Thr Pro Ala Ala Pro Gly Val Arg Leu Ser Ala
 35 40 45

Glu Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala Gln
 50 55 60

Ala Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Ser Asp Leu Leu Val Thr Glu Ala
 65 70 75 80

Arg Asp Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Asp Glu
 85 90 95

Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro
 100 105 110

Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe
 115 120 125

Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg
 130 135 140

Pro Val Pro Ser Lys Pro Gly Asp Leu Pro Phe Phe Ser Leu Met Ser
 145 150 155 160

Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro
 165 170 175

Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn
 180 185 190

- 77 -

Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly
 195 200 205

Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly
 210 215 220

Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ile Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr
 225 230 235 240

Ile Lys Ala Ile Gln Asp Lys Gly Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp
 245 250 255

Pro Arg Leu Pro Ala Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys
 260 265 270

Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Ala Ser Arg Leu Gly Ser Lys
 275 280 285

Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ala Asp Asn Gln
 290 295 300

Gly Tyr Val Leu Gly Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Leu Val Ser Val Gln
 305 310 315 320

Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile
 325 330 335

Leu Arg Pro Leu Ser Ile Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr
 340 345 350

Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile
 355 360 365

Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu
 370 375 380

His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser
 385 390 395 400

Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn
 405 410 415

Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser
 420 425 430

- 78 -

Asp Leu Val Gly Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn
 435 440 445

Pro Arg Ala Ala Asp Pro Leu Ala Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln
 450 455 460

Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His Leu Asp Arg Leu Ala Ala Ala
 465 470 475 480

Lys Ser Ala Leu Gly Gln Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly
 485 490 495

Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr
 500 505 510

Glu Ser Ala Ser Gln Val Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys
 515 520 525

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1847 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: soja

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

- (B) KLON: pWDC-12 (NRRL B-21516)

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 55..1683
- (C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „protox-1 ze sojy“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

CTTTAGCACA GTGTTGAAGA TAACGAACGA ATAGTGCCAT TACTGTAACC AACC ATG	57
Met	
1	
GTT TCC GTC TTC AAC GAG ATC CTA TTC CCG CCG AAC CAA ACC CTT CTT	105
Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu Leu	
5 10 15	
CGC CCC TCC CTC CAT TCC CCA ACC TCT TTC TTC ACC TCT CCC ACT CGA	153
Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr Arg	
20 25 30	
AAA TTC CCT CGC TCT CGC CCT AAC CCT ATT CTA CGC TGC TCC ATT GCG	201
Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile Ala	
35 40 45	
GAG GAA TCC ACC GCG TCT CCG CCC AAA ACC AGA GAC TCC GCC CCC GTG	249
Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro Val	
50 55 60 65	
GAC TGC GTC GTC GTC GGC GGA GGC GTC AGC GGC CTC TGC ATC GCC CAG	297
Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln	
70 75 80	
GCC CTC GCC ACC AAA CAC GCC AAT GCC AAC GTC GTC GTC ACG GAG GCC	345
Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu Ala	
85 90 95	
CGA GAC CGC GTC GGC GGC AAC ATC ACC ACG ATG GAG AGG GAC GGA TAC	393
Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly Tyr	
100 105 110	
CTC TGG GAA GAA GGC CCC AAC AGC TTC CAG CCT TCT GAT CCA ATG CTC	441
Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu	
115 120 125	
ACC ATG GTG GTG GAC AGT GGT TTA AAG GAT GAG CTT GTT TTG GGG GAT	489
Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly Asp	
130 135 140 145	
CCT GAT GCA CCT CGG TTT GTG TTG TGG AAC AGG AAG TTG AGG CCG GTG	537
Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro Val	
150 155 160	
CCC GGG AAG CTG ACT GAT TTG CCT TTC TTT GAC TTG ATG AGC ATT GGT	585

Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly	
165 170 175	
GGC AAA ATC AGG GCT GGC TTT GGT GCG CTT GGA ATT CGG CCT CCT CCT	633
Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Pro	
180 185 190	
CCA GGT CAT GAG GAA TCG GTT GAA GAG TTT GTT CGT CGG AAC CTT GGT	681
Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly	
195 200 205	
GAT GAG GTT TTT GAA CGG TTG ATA GAG CCT TTT TGT TCA GGG GTC TAT	729
Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr	
210 215 220 225	
GCA GGC GAT CCT TCA AAA TTA AGT ATG AAA GCA GCA TTC GGG AAA GTT	777
Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val	
230 235 240	
TGG AAG CTG GAA AAA AAT GGT GGT AGC ATT ATT GGT GGA ACT TTC AAA	825
Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys	
245 250 255	
GCA ATA CAA GAG AGA AAT GGA GCT TCA AAA CCA CCT CGA GAT CCG CGT	873
Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg	
260 265 270	
CTG CCA AAA CCA AAA GGT CAG ACT GTT GGA TCT TTC CGG AAG GGA CTT	921
Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu	
275 280 285	
ACC ATG TTG CCT GAT GCA ATT TCT GCC AGA CTA GGC AAC AAA GTA AAG	969
Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val Lys	
290 295 300 305	
TTA TCT TGG AAG CTT TCA AGT ATT AGT AAA CTG GAT AGT GGA GAG TAC	1017
Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu Tyr	
310 315 320	
AGT TTG ACA TAT GAA ACA CCA GAA GGA GTG GTT TCT TTG CAG TGC AAA	1065
Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys Lys	
325 330 335	
ACT GTT GTC CTG ACC ATT CCT TCC TAT GTT GCT AGT ACA TTG CTG CGT	1113
Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu Arg	

340	345	350	
CCT CTG TCT GCT GCT GCT GCA GAT GCA CTT TCA AAG TTT TAT TAC CCT			1161
Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr Pro			
355	360	365	
CCA GTT GCT GCA GTT TCC ATA TCC TAT CCA AAA GAA GCT ATT AGA TCA			1209
Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Ser			
370	375	380	385
GAA TGC TTG ATA GAT GGT GAG TTG AAG GGG TTT GGT CAA TTG CAT CCA			1257
Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro			
390	395	400	
CGT AGC CAA GGA GTG GAA ACA TTA GGA ACT ATA TAC AGC TCA TCA CTA			1305
Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu			
405	410	415	
TTC CCC AAC CGA GCA CCA CCT GGA AGG GTT CTA CTC TTG AAT TAC ATT			1353
Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile			
420	425	430	
GGA GGA GCA ACT AAT ACT GGA ATT TTA TCG AAG ACG GAC AGT GAA CTT			1401
Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu Leu			
435	440	445	
GTG GAA ACA GTT GAT CGA GAT TTG AGG AAA ATC CTT ATA AAC CCA AAT			1449
Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro Asn			
450	455	460	465
GCC CAG GAT CCA TTT GTA GTG GGG GTG AGA CTG TGG CCT CAA GCT ATT			1497
Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala Ile			
470	475	480	
CCA CAG TTC TTA GTT GGC CAT CTT GAT CTT CTA GAT GTT GCT AAA GCT			1545
Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys Ala			
485	490	495	
TCT ATC AGA AAT ACT GGG TTT GAA GGG CTC TTC CTT GGG GGT AAT TAT			1593
Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr			
500	505	510	
GTG TCT GGT GTT GCC TTG GGA CGA TGC GTT GAG GGA GCC TAT GAG GTA			1641
Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val			
515	520	525	

GCA GCT GAA GTA AAC GAT TTT CTC ACA AAT AGA GTG TAC AAA 1683
 Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys
 530 535 540

TAGTAGCAGT TTTTGT TTTT GTGGTGGAAT GGGTGATGGG ACTCTCGTGT TCCATTGAAT 1743

TATAATAATG TGAAAGTTTC TCAAATTCGT TCGATAGGTT TTTGGCGGCT TCTATTGCTG 1803

ATAATGTAAA ATCCTCTTTA AGTTTGAAAA AAAAAAAAAA AAAA 1847

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKQUENCE:
 (A) DÉLKA: 543 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKQUENCE: SEKQUENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

Met Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu
 1 5 10 15

Leu Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr
 20 25 30

Arg Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile
 35 40 45

Ala Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro
 50 55 60

Val Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly
 100 105 110

Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met

25.08.99

- 83 -

115	120	125
Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly		
130	135	140
Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro		
145	150	155 160
Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile		
165	170	175
Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro		
180	185	190
Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu		
195	200	205
Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val		
210	215	220
Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys		
225	230	235 240
Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe		
245	250	255
Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro		
260	265	270
Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly		
275	280	285
Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val		
290	295	300
Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu		
305	310	315 320
Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys		
325	330	335
Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu		
340	345	350
Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr		

25.08.98

- 84 -

355	360	365
Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg		
370	375	380
Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His		
385	390	395 400
Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser		
405	410	415
Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr		
420	425	430
Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu		
435	440	445
Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro		
450	455	460
Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala		
465	470	475 480
Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys		
485	490	495
Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn		
500	505	510
Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu		
515	520	525
Val Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys		
530	535	540

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 583 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: promotor

(B) POZICE: 1..583

(C) DALŠÍ INFORMACE: /funkce = „promotor protox-1 z *Arabidopsis*“

(xi) POPIS SEKvence: SEKvence S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

GAATTCGAT CGAATTATAT AATTATCATA AATTGAATA AGCATGTTGC CTTTATTAA	60
AGAGGTTTAA TAAAGTTTGG TAATAATGGA CTTTGACTTC AAACGATT CTCATGTAAT	120
TAATTAATAT TTACATCAAA ATTTGGTCAC TAATATTACC AAATTAATAT ACTAAAATGT	180
TAATTCGCAA ATAAAACACT AATCCAAAT AAAGGGTCAT TATGATAAAC ACGTATTGAA	240
CTTGATAAAG CAAAGCAAAA ATAATGGGTT TCAAGGTTTG GGTATATAT GACAAAAAAA	300
AAAAAAGGTT TGGTTATATA TCTATTGGGC CTATAACCAT GTTATACAAA TTTGGGCCTA	360
ACTAAAATAA TAAAATAAAC GTAATGGTCC TTTTATATT TGGGTCAAAC CCAACTCTAA	420
ACCCAAACCA AAGAAAAAGT ATACGGTACG GTACACAGAC TTATGGTGTG TGTGATTGCA	480
GGTGAATATT TCTCGTCGTC TTCTCCTTTC TTCTGAAGAA GATTACCCAA TCTGAAAAA	540
ACCAAGAAGC TGACAAAATT CCGAATTCTC TGCGATTTC ATG	583

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

(A) DÉLKA: 3848 párů bazí

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

25.08.98

- 86 -

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: promotor

(B) POZICE: 1..3848

(C) DALŠÍ INFORMACE: /funkce = „promotor protox-1 z kukuřice“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

TCGATCTTTC TAGGCTGATC CCCAAATCTT CCTCCGAAGC CCCTGGCGCC TCTGCCCCTT	60
GGAGCTGGTG GCCTGAAAGA GCTTTGCTGT TGCCCCGAAG ATTGTGAGGT ATATTGTGAC	120
CTCTGAGACT GACTTCCTTT GTCGTCACCT TGAGTGGAGT TATGGATTGA CCTGACGTGC	180
CTCAGATGGA TTCTTCCTCC GAAGCCCCCTG GTCATTTCCG AGAATCTGTA ATCTTATTCC	240
CTTCTTTGGC GAAAATCTGT CAGCTTGGAT GTACTCATCC ATCTTCTGAA GCAGCTTCTC	300
CAGAGTTTGT GGAGGCTTCC TGGCGAAATA TTGGGCTGTA GGTCCCTGGAC GAAGACCCTT	360
GATCATGGCC TCAATGACAA TCTCATTGGG CACCGTAGGC GCTTGTGCCC TCAATCGCAA	420
GAACCTTCGT ACATATGCCT GAAGGTATTC TTCGTGATCT TGTGTGCATT GGAACAGAGC	480
CTGAGCTGTG ACCGACTTCG TTTGAAAGCC TTGGAAGCTA GTAACCAACA TGTGCTTAAG	540
CTTCTGCCAC GACGTGATAG TCCCTGGCCG AAGAGAAGAA TACCATGTTT GGGCTACATT	600
CCGGACTGCC ATGACGAAGG ACTTCGCCAT GACTACAGTG TTGACCCCAT ACGAAGATAT	660
AGTTGCTTCG TAGCTCATCA GAAACTGCTT TGGATCTGAG TGCCCATCAT ACATGGGGAG	720
CTGAGGTGGC TTGTATGATG GGGGCCATGG GGTAGCCTGC AGTTCTGCTG CCAAGGGAGA	780
AGCATCATCA AAAGTAAAGG CATCATGATT AAAATCATCA TACCATCCAT CCTCGTTGAA	840
TAAGCCTTCT TGACGAAGCT CCCTGTGTTG GGGCCTTCGA TCTTGTTTCT CTTGAACAAG	900
ATGACGCACT TCTTCAGTGG CTTCGTCGAT CTTTCTTTGG AGATCAGCCA GTCGCACCAT	960
CTTCTCCTTC TTTCTTTGTA CTTGTTGATG GATGATCTCC ATGTCCCTGA TCTCTTGGTC	1020
CAACTCCTCC TCTTGGAGTG TCAGACTGGT GGCTTTTCTC TTCTGGCTTC GAGCCTCTCG	1080
AAGAGAAAGA GTTTCTTGAT TTGGGTCCAG CGGCTGCAGT GCAGTGGTCC CTGGTGCTGA	1140

25.08.98

- 87 -

AGCTTTCTTC GGTGGCATGA CAAAGGTCAG TGCTTGCCGA AGGTGGTCGA AAAGGGTTCA 1200

CTAGAGGTGG GAGCCAATGT TGGGGACTTC TCAAGTGCTA TGAGTTAAGA ACAAGGCAAC 1260

ACAAAATGTT AAATATTAAT AGCTTTCATC TTTCGAAGCA TTATTTCCCT TTGGGTATAA 1320

TGATCTTCAG ACGAAAGAGT CCTTCATCAT TGCATATAT GTTAATAGAA GGAGGAGCAT 1380

ATGAAATGTA AGAGACAACA TGAACAATCG TGTAGCATTG TTAATTCATC ATCATTTTAT 1440

TATTATGGAA AAATAGAAAC AATATTGAAT TACAAATGTA CCTTTGGCTT GACAGAAGAT 1500

AAAAGTACAA GCTTGACGCA CGAGCAAGTA CAAGTCAGTG TGAACAGTAC GGGGGTACTG 1560

TTCATCTATT TATAGGCACA GGACACAGCC TGTGAGAAAT TACAGTCATG CCCTTTACAT 1620

TTACTATTGA CTTATAGAAA AATCTATGAG GACTGGATAG CCTTTTCCCC TTTAAGTCGG 1680

TGCCTTTTTTC CGCGATTAAAG CCGAATCTCC CTTGCGCATA GCTTCGGAGC ATCGGCAACC 1740

TTCGTCACGA TCATGCCCTT CTCATTGTGT ATGCTTTTAA TCCTGAATTC GAAGGTACCT 1800

GTCCATAAAC CATACTTGGA AGACATTGTT AAATTATGTT TTTGAGGACC TTCGGAGGAC 1860

GAAGGCCCCC AACAGTCGTG TTTTGTAGGA CCTTCGGAAG ATGAAGGCCC CCAACAAGAC 1920

CTATCCATAA AACCAACCTA TCCACAAAAC CGACCCCAT TACCCTTCAT TTGCCTCACC 1980

AACAACCCTA ATTAGGTTGT TGGTTTAAAT TTTTATAGGT CAATTGGTC ATCACCATCC 2040

ACTGTCACTC CACAACTCA ATATCAATAA ACAGACTCAA TCACCCAAAC TGACCATACC 2100

CATAAAACCG CCCACCCCTT CTAGCGCCTC GCCAGAAACC AGAAACCCTG ATTCAGAGTT 2160

CAAACCTAAA ACGACCATAA CTTTCACCTT GGAACCTGAA TCAGGTCCAT TTTTTCCTAA 2220

ATCACACAAA ATTAAATTC GCATCCGATA ATCAAGCCAT CTCTTCACTA TGGTTTAAAG 2280

TGTTGCTCAC ACTAGTGAT TTATGGACTA ATCACCTGTG TATCTCATAC AATAACATAT 2340

CAGTACATCT AAGTTGTTAC TCAATTACCA AAACCGAATT ATAGCCTTCG AAAAAGGTTA 2400

TCGACTAGTC ACTCAATTAC CAAAACCTAA CTTTAGACTT TCATGTATGA CATCCAACAT 2460

GACACTGTAC TGGACTAAAC CACCTTTCAA GCTACACAAG GAGCAAAAAT AACTAATTTT 2520

25.08.98

- 88 -

CGTAGTTGTA GGAGCTAAAG TATATGTCCA CAACAATAGT TAAGGGAAGC CCCCAGGAC	2580
TTAAAAGTCC TTTTACCTCT TGAAACTTTT GTCGTGGTCT ACTTTTTCAC TTAAACTTC	2640
AAAATTTGAC ATTTTATCAC CCCTTAACTC TTAAACCAT TTAAATTACA TTCTTACTAG	2700
ATTATAGATG ATTTTGTGT GAAAAGTTT TAAGACATGT TTACACATTG ATTAAAATCA	2760
TTTGTTCAT TTCCTAGAGT TAAATCTAAT CTTATTAAAA CTATTAGAGA TACTTTCACG	2820
AGCTCTAAAT ATTTTATTT TTTCATTATG GAATTTTGTT AGAATTCTTA TAGACCTTTT	2880
TTGTGGTTT AAAAGCCTTG CCATGTTTTT AACAAGTTTT TTTTCTATTT TTTGAAATTT	2940
TCTTGAAAC CACTTCTAAC CCGGTAGAAG ATTTATTTTG CTACACTTAT ATCTACAACA	3000
AAATCAACTT ATGAAATTGT CTTGGAAACT ACCTCTAACC CGGTAGAATG AATTTGAATG	3060
AAAATTAAAC CAACTTACGG AATCGCCCAA CATATGTCGA TTAAAGTGA TATGGATACA	3120
TATGAAGAAG CCCTAGAGAT AATCTAAATG GTTTCAGAAT TGAGGGTTAT TTTTGAAGT	3180
TTGATGGGAA GATAAGACCA TAACGGTAGT TCACAGAGAT AAAAGGGTTA TTTTTTTCAG	3240
AAATATTTGT GCTGCAATTG ATCCTGTGCC TCAAATTCAG CCTGCAACCA AGGCCAGGTT	3300
CTAGAGCGAA CAAGGCCAC GTCACCCGTG GCCCGTCAGG CGAAGCAGGT CTTGTGCAGA	3360
CTTTGAGAGG GATTGGATAT CAACGGAACC AATCACGCAC GGCAATGCGA TTCCCAGCCC	3420
ACCTGTAACG TTCCAGTGGG CCATCCTTAA CTCCAAGCCC AACGGCCCTA CCCCATCTCG	3480
TCGTGTCATC CACTCCGCC CACAGGCGCT CAGCTCCGA ACGCCGCCG AAATGGTCGC	3540
CGCCACAGCC ACCGCCATGG CCACCGCTGC ATCGCCGCTA CTCAACGGGA CCCGAATACC	3600
TGCGCGGCTC CGCCATCGAG GACTCAGCGT GCGCTGCGCT GCTGTGGCGG GCGGCGGGC	3660
CGAGGCACCG GCATCCACCG GCGCGGGCT GTCCGCGGAC TGCGTTGTGG TGGGCGGAGG	3720
CATCAGTGGC CTCTGCACCG CGCAGGCGCT GGCCACGCGG CACGGCGTCG GGGACGTGCT	3780
TGTCACGGAG GCCCGCGCCC GCGCGGGCG CAACATTACC ACCGTCGAGC GCGCGAGGA	3840

AGGGTACC

3848

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1826 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: *Gossypium hirsutum* (bavlník)

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

- (B) KLON: pWDC-15 (NRRL B-21594)

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ:
- (B) POZICE: 31..1674
- (C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „kódující oblast
protox-1 z bavlníku“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

CCTCTCGCTC GCCTGGCCCC ACCACCAATC ATGACGGCTC TAATCGACCT TTCTCTTCTC	60
CGTTCCTCGC CCTCCGTTTC CCCTTTCTCC ATACCCACC ACCAGCATCC GCCCCGCTTT	120
CGTAAACCTT TCAAGCTCCG ATGCTCCCTC GCCGAGGGTC CCACGATTTC CTCATCTAAA	180
ATCGACGGGG GAGAATCATC CATCGCGGAT TGCATCATCG TTGGAGGTGG TATCAGTGGA	240
CTTTGCATTG CTCAAGCTCT CGCCACCAAG CACCGTGACG TCGCTTCAA TGTGATTGTG	300
ACGGAGGCCA GAGACCGTGT TGGTGGCAAC ATCACTACCG TTGAGAGAGA TGGATATCTG	360
TGGGAAGAAG GCCCAACAG TTTTCAGCCC TCCGATCCTA TTCTAACCAT GGCCGTGGAT	420

AGTGGATTGA AGGACGATTT GGTTTTAGGT GACCCTAATG CACCGCGATT TGTACTATGG	480
GAGGGAAAAC TAAGGCCTGT GCCCTCCAAG CCAACCGACT TGCCGTTTTT TGATTTGATG	540
AGCATTGCTG GAAAACTTAG GGCTGGGTTC GGGGCTATTG GCATTGCGCC TCCCCCTCCG	600
GGTTATGAAG AATCGGTGGA GGAGTTTGTG CGCCGTAATC TTGGTGCTGA GGTTTTTGAA	660
CGCTTTATTG AACCATTTTG TTCAGGTGTT TATGCAGGGG ATCCTTCAA ATTAAAGCATG	720
AAAGCAGCAT TTGGAAGAGT ATGGAAGCTA GAAGAGATTG GTGGCAGCAT CATTGGTGGC	780
ACTTTCAAGA CAATCCAGGA GAGAAATAAG ACACCTAAGC CACCCAGAGA CCCGCGTCTG	840
CCAAAACCGA AGGGCCAAAC AGTTGGATCT TTTAGGAAGG GACTTACCAT GCTGCCTGAG	900
GCAATTGCTA ACAGTTTGGG TAGCAATGTA AAATTATCTT GGAAGCTTTC CAGTATTACC	960
AAATTGGGCA ATGGAGGGTA TAACTTGACA TTTGAAACAC CTGAAGGAAT GGTATCTCTT	1020
CAGAGTAGAA GTGTTGTAAT GACCATTCCA TCCCATGTTG CCAGTAACTT GTTGCATCCT	1080
CTCTCGGCTG CTGCTGCAGA TGCATTATCC CAATTTTATT ATCCTCCAGT TGCATCAGTC	1140
ACAGTCTCCT ATCCAAAAGA AGCCATTCTGA AAAGAATGTT TGATTGATGG TGAACCTAAG	1200
GGGTTTGGCC AGTTGCACCC ACGCAGCCAA GGAATTGAAA CTTTAGGGAC GATATACAGT	1260
TCATCACTTT TCCCCAATCG AGCTCCATCT GGCAGGGTGT TGCTCTTGAA CTACATAGGA	1320
GGAGCTACCA AACTGGAAT TTTGTCCAAG ACTGAAGGGG AACTTGTAGA AGCAGTTGAT	1380
CGTGATTGA GAAAAATGCT TATAAATCCT AATGCAAAGG ATCCTCTTGT TTTGGGTGTA	1440
AGAGTATGGC CAAAAGCCAT TCCACAGTTC TTGGTTGGTC ATTTGGATCT CCTTGATAGT	1500
GCAAAAATGG CTCTCAGGGA TTCTGGGTTT CATGGACTGT TTCTTGGGGG CAACTATGTA	1560
TCTGGTGTGG CATTAGGACG GTGTGTGGAA GGTGCTTACG AGGTTGCAGC TGAAGTGAAG	1620
GAATTCCTGT CACAATATGC ATACAAATAA TATTGAAATT CTTGTCAGGC TGCAAATGTA	1680
GAAGTCAGTT ATTGGATAGT ATCTCTTTAG CTAAAAAATT GGGTAGGGTT TTTTTGTGA	1740

GTTCCCTTGAC CACTTTTTTGG GGTTCATT AGAACTTCAT ATTTGTATAT CATGTTGCAA 1800
 TATCAAAAAA AAAAAAARA AAAAAA 1826

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 539 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: není relevantní
- (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

Met Thr Ala Leu Ile Asp Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ser Pro Ser Val
 1 5 10 15

Ser Pro Phe Ser Ile Pro His His Gln His Pro Pro Arg Phe Arg Lys
 20 25 30

Pro Phe Lys Leu Arg Cys Ser Leu Ala Glu Gly Pro Thr Ile Ser Ser
 35 40 45

Ser Lys Ile Asp Gly Gly Glu Ser Ser Ile Ala Asp Cys Val Ile Val
 50 55 60

Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys
 65 70 75 80

His Arg Asp Val Ala Ser Asn Val Ile Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg
 85 90 95

Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu
 100 105 110

Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Ile Leu Thr Met Ala
 115 120 125

Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asn Ala
 130 135 140

25.08.90

- 92 -

Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys
145 150 155 160

Pro Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Ala Gly Lys Leu
165 170 175

Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Ile Arg Pro Pro Pro Gly Tyr
180 185 190

Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val
195 200 205

Phe Glu Arg Phe Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp
210 215 220

Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Arg Val Trp Lys Leu
225 230 235 240

Glu Glu Ile Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Thr Ile Gln
245 250 255

Glu Arg Asn Lys Thr Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu
275 280 285

Pro Glu Ala Ile Ala Asn Ser Leu Gly Ser Asn Val Lys Leu Ser Trp
290 295 300

Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Leu Gly Asn Gly Gly Tyr Asn Leu Thr
305 310 315 320

Phe Glu Thr Pro Glu Gly Met Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val
325 330 335

Met Thr Ile Pro Ser His Val Ala Ser Asn Leu Leu His Pro Leu Ser
340 345 350

Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Gln Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala
355 360 365

Ser Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu
370 375 380

Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln
385 390 395 400

Gly Ile Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn
405 410 415

Arg Ala Pro Ser Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala
420 425 430

Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala
435 440 445

Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Asn Ala Lys Asp
450 455 460

Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Lys Ala Ile Pro Gln Phe
465 470 475 480

Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Ser Ala Lys Met Ala Leu Arg
485 490 495

Asp Ser Gly Phe His Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly
500 505 510

Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ala Glu
515 520 525

Val Lys Glu Phe Leu Ser Gln Tyr Ala Tyr Lys
530 535

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1910 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: *Beta vulgaris* (řepa cukrovka)

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

(B) KLON: pWDC-16 (NRRL B-21595N)

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ:

(B) POZICE: 1..1680

(C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „kódující oblast
protox-1 z řepy cukrovky“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

ATGAAATCAA TGGCGTTATC AAACGTCATT CCACAGACAC AGTGCATGCC ATTGCGCAGC	60
AGCGGGCATT ACAGGGGTAA TTGTATCATG TTGTCAATTC CATGTAGTTT AATTGGAAGA	120
CGAGGTTATT ATTCACATAA GAAGAGGAGG ATGAGCATGA GTTGCAGCAC AAGCTCAGGC	180
TCAAAGTCAG CGGTTAAAGA AGCAGGATCA GGATCAGGTG CAGGAGGATT GCTAGACTGC	240
GTAATCGTTG GAGGTGGAAT TAGCGGGCTT TGCATCGCGC AGGCTCTTTG TACAAAACAC	300
TCCTCTTCCT CTTTATCCCC AAATTTTATA GTTACAGAGG CCAAAGACAG AGTTGGCGGC	360
AACATCGTCA CTGTGGAGGC CGATGGCTAT ATCTGGGAGG AGGGACCCAA TAGCTTCCAG	420
CCTTCCGACG CGGTGCTCAC CATGGCGGTC GACAGTGGCT TGAAAGATGA GTTGGTGCTC	480
GGAGATCCCA ATGCTCCTCG CTTTGTGCTA TGAATGACA AATTAAGGCC CGTACCTTCC	540
AGTCTCACCG ACCTCCCTTT CTTGACCTC ATGACCATTG CGGGCAAGAT TAGGGCTGCT	600
CTTGGTGCTC TCGGATTTG CCCTTCTCCT CCACCTCATG AGGAATCTGT TGAACACTTT	660
GTGCGTCGTA ATCTCGGAGA TGAGGTCTTT GAACGCTTGA TTGAACCCTT TTGTTCAAGT	720
GTGTATGCCG GTGATCCTGC CAAGCTGAGT ATGAAAGCTG CTTTGGGAA GGTCTGGAAG	780
TTGGAGCAA AGGGTGGCAG CATAATTGGT GGCACCTCTCA AAGCTATACA GGAAAGAGGG	840
AGTAATCCTA AGCCGCCCCG TGACCAGCGC CTCCTAAAC CAAAGGGTCA GACTGTTGGA	900

TCCTTTAGAA AGGGACTCGT TATGTTGCCT ACCGCCATTT CTGCTCGACT TGGCAGTAGA	960
GTGAAACTAT CTTGGACCCT TTCTAGTATC GTAAAGTCAC TCAATGGAGA ATATAGTCTG	1020
ACTTATGATA CCCCAGATGG CTTGGTTTCT GTAAGAACCA AAAGTGTGTG GATGACTGTT	1080
CCATCATATG TTGCAAGTAG GCTTCTTCGT CCACTTTCAG ACTCTGCTGC AGATTCTCTT	1140
TCAAAATTTT ACTATCCACC AGTTGCAGCA GTGTCACTTT CCTATCCTAA AGAAGCGATC	1200
AGATCAGAAT GCTTGATTAA TGGTGAACCT CAAGGTTTCG GGCAACTACA TCCCCGCACT	1260
CAGGGTGTGG AAACCTTGGG AACAATTTAT AGTTCGTCTC TTTTCCCTGG TCGAGCACCA	1320
CCTGGTAGGA TCTTGATCTT GAGCTACATC GGAGGTGCTA AAAATCCTGG CATATTAAAC	1380
AAGTCGAAAG ATGAACTTGC CAAGACAGTT GACAAGGACC TGAGAAGAAT GCTTATAAAT	1440
CCTGATGCAA AACTTCCTCG TGTACTGGGT GTGAGAGTAT GGCCTCAAGC AATACCCAG	1500
TTTTCTATTG GGCACCTTGA TCTGCTCGAT GCTGCAAAAAG CTGCTCTGAC AGATACAGGG	1560
GTCAAAGGAC TGTTTCTTGG TGGCAACTAT GTTTCAGGTG TTGCCTGGG GCGGTGTATA	1620
GAGGGTGCTT ATGAGTCTGC AGCTGAGGTA GTAGATTTCC TCTCACAGTA CTCAGACAAA	1680
TAGAGCTTCA GCATCCTGTG TAATTCAACA CAGGCCTTTT TGTATCTGTT GTGCGCGCAT	1740
GTAGTCTGGT CGTGGTGCTA GGATTGATTA GTTGCTCTGC TGTGTGATCC ACAAGAATTT	1800
TGATGGAATT TTTCCAGATG TGGGCATTAT ATGTTGCTGT CTTATAAATC CTTAATTTGT	1860
ACGTTTAGTG AATTACACCG CATTTGATGA CTAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1910

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKvence:

- (A) DÉLKA: 560 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: není relevantní
- (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: protein

25.08.98

- 96 -

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

Met Lys Ser Met Ala Leu Ser Asn Cys Ile Pro Gln Thr Gln Cys Met
 1 5 10 15
 Pro Leu Arg Ser Ser Gly His Tyr Arg Gly Asn Cys Ile Met Leu Ser
 20 25 30
 Ile Pro Cys Ser Leu Ile Gly Arg Arg Gly Tyr Tyr Ser His Lys Lys
 35 40 45
 Arg Arg Met Ser Met Ser Cys Ser Thr Ser Ser Gly Ser Lys Ser Ala
 50 55 60
 Val Lys Glu Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ala Gly Gly Leu Leu Asp Cys
 65 70 75 80
 Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu
 85 90 95
 Cys Thr Lys His Ser Ser Ser Ser Leu Ser Pro Asn Phe Ile Val Thr
 100 105 110
 Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Val Thr Val Glu Ala Asp
 115 120 125
 Gly Tyr Ile Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Ala
 130 135 140
 Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu
 145 150 155 160
 Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Asp Lys Leu Arg
 165 170 175
 Pro Val Pro Ser Ser Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Thr
 180 185 190
 Ile Pro Gly Lys Ile Arg Ala Ala Leu Gly Ala Leu Gly Phe Arg Pro
 195 200 205
 Ser Pro Pro Pro His Glu Glu Ser Val Glu His Phe Val Arg Arg Asn
 210 215 220

25.08.98

- 97 -

Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly
 225 230 235 240

Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ala Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly
 245 250 255

Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln Lys Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr
 260 265 270

Leu Lys Ala Ile Gln Glu Arg Gly Ser Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp
 275 280 285

Gln Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys
 290 295 300

Gly Leu Val Met Leu Pro Thr Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Arg
 305 310 315 320

Val Lys Leu Ser Trp Thr Leu Ser Ser Ile Val Lys Ser Leu Asn Gly
 325 330 335

Glu Tyr Ser Leu Thr Tyr Asp Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Arg
 340 345 350

Thr Lys Ser Val Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Arg Leu
 355 360 365

Leu Arg Pro Leu Ser Asp Ser Ala Ala Asp Ser Leu Ser Lys Phe Tyr
 370 375 380

Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Leu Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile
 385 390 395 400

Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asn Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu
 405 410 415

His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser
 420 425 430

Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Pro Gly Arg Ile Leu Ile Leu Ser
 435 440 445

Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Asn Pro Gly Ile Leu Asn Lys Ser Lys Asp
 450 455 460

25.08.98

- 98 -

Glu Leu Ala Lys Thr Val Asp Lys Asp Leu Arg Arg Met Leu Ile Asn
465 470 475 480

Pro Asp Ala Lys Leu Pro Arg Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln
485 490 495

Ala Ile Pro Gln Phe Ser Ile Gly His Phe Asp Leu Leu Asp Ala Ala
500 505 510

Lys Ala Ala Leu Thr Asp Thr Gly Val Lys Gly Leu Phe Leu Gly Gly
515 520 525

Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr
530 535 540

Glu Ser Ala Ala Glu Val Val Asp Phe Leu Ser Gln Tyr Ser Asp Lys
545 550 555 560

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1784 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: *Brassica napus* (řepka olejka)

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

(B) KLON: pWDC-17 (NRRL B-21615)

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ:

(B) POZICE: 47..1654

(C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „kódující oblast
protox-1 z řepky olejky“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

GGGCCCCCCC CAAAATTGAG GATTCTCCTT CTCGCGGGCG ATCGCCATGG ATTTATCTCT	60
TCTCCGTCCG CAGCCATTCC TATCGCCATT CTCAAATCCA TTTCCTCGGT CGCGTCCCTA	120
CAAGCCTCTC AACCTCCGTT GCTCCGTATC CGGTGGATCC GTCGTCGGCT CTTCTACAAT	180
CGAAGGCGGA GGAGGAGGTA AAACCGTCAC GGCGGACTGC GTGATCGTCG GCGGAGGAAT	240
CAGCGGCCTG TGCATTGCGC AAGCGCTCGT GACGAAGCAC CCAGACGCTG CAAAGAATGT	300
GATGGTGACG GAGGCGAAGG ACCGTGTGGG AGGGAATATC ATCACGCGAG AGGAGCAAGG	360
GTTTCTATGG GAAGAAGGTC CCAATAGCTT TCAGCCGTCT GATCCTATGC TCACTATGGT	420
GGTAGATAGT GGTTTGAAAG ATGATCTAGT CTTGGGAGAT CCTACTGCTC CGAGGTTTGT	480
GTTGTGGAAT GGGAAGCTGA GGCCGGTTCC GTCGAAGCTA ACTGACTGTC CTTTCTTTGA	540
CTTGATGAGT ATTGGAGGGA AGATTAGAGC TGGGTTTGGT GCCATTGGTA TTCGACCTTC	600
ACCTCCGGGT CGTGAGGAAT CAGTGGAAGA GTTTGTAAGG CGTAATCTTG GTGATGAGGT	660
TTTTGAGCGC TTGATTGAAC CCTTTTGCTC AGGTGTTTAT GCGGGAGATC CTGCGAAACT	720
GAGTATGAAA GCAGCTTTTG GGAAGGTTTG GAAGCTAGAG GAGAATGGTG GGAGCATCAT	780
TGGTGGTGCT TTAAAGGCAA TTCAAGCGAA AAATAAAGCT CCCAAGACAA CCCGAGATCC	840
GCGTCTGCCA AAGCCAAAGG GCCAAACTGT TGGTTCTTTC AGGAAAGGAC TCACAATGCT	900
GCCAGAGGCA ATCTCCGCAA GGTGGGTGA CAAGGTGAAA GTTTCCTTGA AGCTCTCAAG	960
TATCACTAAG CTGGCCAGCG GAGAATATAG CTTAACTTAC GAAACTCCGG AGGGTATAGT	1020
CACTGTACAG AGCAAAAGTG TAGTGATGAC TGTGCCATCT CATGTTGCTA GTAGTCTCTT	1080
GCGCCCTCTC TCTGATTCTG CAGCTGAAGC GCTCTCAAAA CTCTACTATC CGCCAGTTGC	1140
AGCCGTATCC ATCTCATACG CGAAAGAAGC AATCCGAAGC GAATGCTTAA TAGATGGTGA	1200
ACTAAAAGGG TTCGGCCAGT TGCATCCACG CACGCAAAAA GTGGAAACTC TTGGAACAAT	1260

ATACAGTTCA TCGCTCTTTC CCAACCGAGC ACCGCCTGGA AGAGTATTGC TATTGAACTA 1320
 CATCGGTGGA GCTACCAACA CTGGGATCTT ATCAAAGTCG GAAGGTGAGT TAGTGGAAGC 1380
 AGTAGATAGA GACTTGAGGA AGATGCTGAT AAAGCCAAGC TCGACCGATC CACTTGTTACT 1440
 TGGAGTAAAA TTATGGCCTC AAGCCATTCC TCAGTTTCTG ATAGGTCACA TTGATTTGGT 1500
 AGACGCAGCG AAAGCATCGC TCTCGTCATC TGGTCATGAG GGCTTATTCT TGGGTGGAAA 1560
 TTACGTTGCC GGTGTAGCAT TGGGTCGGTG TGTGGAAGGT GCTTATGAAA CTGCAACCCA 1620
 AGTGAATGAT TTCATGTCAA GGTATGCTTA CAAGTAATGT AACGCAGCAA CGATTTGATA 1680
 CTAAGTAGTA GATTTTGCAG TTTTGACTTT AAGAACAATC TGTTTGTGAA AAATTCAAGT 1740
 CTGTGATTGA GTAAATTTAT GTATTATTAC TAAAAA AAAA 1784

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 536 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: není relevantní
- (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

Met Asp Leu Ser Leu Leu Arg Pro Gln Pro Phe Leu Ser Pro Phe Ser
 1 5 10 15

Asn Pro Phe Pro Arg Ser Arg Pro Tyr Lys Pro Leu Asn Leu Arg Cys
 20 25 30

Ser Val Ser Gly Gly Ser Val Val Gly Ser Ser Thr Ile Glu Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly Lys Thr Val Thr Ala Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Gly
 50 55 60

25.08.98

- 101 -

Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Val Thr Lys His Pro Asp
65 70 75 80

Ala Ala Lys Asn Val Met Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly
85 90 95

Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Gln Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro
100 105 110

Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser
115 120 125

Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe
130 135 140

Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp
145 150 155 160

Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly
165 170 175

Phe Gly Ala Ile Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser
180 185 190

Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg
195 200 205

Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ala Lys
210 215 220

Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Glu Asn
225 230 235 240

Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Ala Phe Lys Ala Ile Gln Ala Lys Asn
245 250 255

Lys Ala Pro Lys Thr Thr Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly
260 265 270

Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Glu Ala
275 280 285

Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asp Lys Val Lys Val Ser Trp Lys Leu Ser
290 295 300

25.08.98

- 102 -

Ser Ile Thr Lys Leu Ala Ser Gly Glu Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr
305 310 315 320

Pro Glu Gly Ile Val Thr Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr Val
325 330 335

Pro Ser His Val Ala Ser Ser Leu Leu Arg Pro Leu Ser Asp Ser Ala
340 345 350

Ala Glu Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser
355 360 365

Ile Ser Tyr Ala Lys Glu Ala Ile Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly
370 375 380

Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Lys Val Glu
385 390 395 400

Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro
405 410 415

Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr
420 425 430

Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg
435 440 445

Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Ser Ser Thr Asp Pro Leu Val
450 455 460

Leu Gly Val Lys Leu Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly
465 470 475 480

His Ile Asp Leu Val Asp Ala Ala Lys Ala Ser Leu Ser Ser Ser Gly
485 490 495

His Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu
500 505 510

Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Thr Gln Val Asn Asp
515 520 525

Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
530 535

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1224 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché.
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: *Oryza sativa* (rýže)

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

(B) KLON: pWDC-18 (NRRL B-21648)

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ:

(B) POZICE: 1..936

(C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „částečná kódující oblast protox-1 z rýže“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

CGGGCTTTGA AGGCTGCATT TGGGAAGGTG TGGAGGCTGG AGGATACTGG AGGTAGCATT	60
ATTGGTGGAA CCATCAAGAC AATCCAGGAG AGGGGGAAAA ACCCCAAACC GCCGAGGGAT	120
CCCCGCCTTC CAACGCCAAA GGGGCAGACA GTTGCATCTT TCAGGAAGGG TCTGACTATG	180
CTCCCGGATG CTATTACATC TAGGTTGGGT AGCAAAGTCA AACTTTCATG GAAGTTGACA	240
AGCATTACAA AGTCAGACAA CAAAGGATAT GCATTAGTGT ATGAAACACC AGAAGGGGTG	300
GTCTCGGTGC AAGCTAAAAC TGTTGTCATG ACCATCCCAT CATATGTTGC TAGTGATATC	360
TTGCGGCCAC TTTCAAGTGA TGCAGCAGAT GCTCTGTCAA TATTCTATTA TCCACCAGTT	420
GCTGCTGTAA CTGTTTCATA TCCAAAAGAA GCAATTAGAA AAGAATGCTT AATTGACGGA	480

GAGCTCCAGG GTTTCGGCCA GCTGCATCCG CGTAGTCAGG GAGTTGAGAC TTTAGGAACA 540
 ATATATAGCT CATCACTCTT TCCAAATCGT GCTCCAGCTG GAAGGGTGTT ACTTCTGAAC 600
 TACATAGGAG GTTCTACAAA TACAGGGATT GTTTCCAAGA CTGAAAGTGA GCTGGTAGAA 660
 GCAGTTGACC GTGACCTCAG GAAGATGCTG ATAAATCCTA GAGCAGTGA CCCTTTGGTC 720
 CTTGGCGTCC GGGTATGGCC ACAAGCCATA CCACAGTTCC TCATTGGCCA TCTTGATCAT 780
 CTTGAGGCTG CAAAATCTGC CCTGGGCAA GGTGGGTATG ATGGATTGTT CCTCGGAGGG 840
 AACTATGTTG CAGGAGTTGC CCTGGGCCGA TCGGTTGAAG GTGCATATGA GAGTGCCTCA 900
 CAAATATCTG ACTACTTGAC CAAGTACGCC TACAAGTGAT CAAAGTTGGC CTGCTCCTTT 960
 TGGCACATAG ATGTGAGGCT TCTAGCAGCA AAAATTTTCAT GGGCATCTTT TTATCCTGAT 1020
 TCTAATTAGT TAGAATTTAG AATTGTAGAG GAATGTTCCA TTTGCAGTTC ATAATAGTTG 1080
 TTCAGATTTT AGCCATTCAA TTTGTGCAGC CATTTACTAT ATGTAGTATG ATCTTGTAAG 1140
 TACTACTAAG AACAAATCAA TTATATTTTC CTGCAAGTGA CATCTTAATC GTCAGCAAAT 1200
 CCAGTTACTA GTAAAAA AAAA 1224

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 312 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: není relevantní
- (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

Arg Ala Leu Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Asp Thr
 1 5 10 15

25.08.98

- 105 -

Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Gly			
20	25	30	
Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Thr Pro Lys Gly			
35	40	45	
Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala			
50	55	60	
Ile Thr Ser Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr			
65	70	75	80
Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asn Lys Gly Tyr Ala Leu Val Tyr Glu Thr			
85	90	95	
Pro Glu Gly Val Val Ser Val Gln Ala Lys Thr Val Val Met Thr Ile			
100	105	110	
Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala			
115	120	125	
Ala Asp Ala Leu Ser Ile Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr			
130	135	140	
Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly			
145	150	155	160
Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu			
165	170	175	
Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro			
180	185	190	
Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr			
195	200	205	
Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg			
210	215	220	
Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Arg Ala Val Asp Pro Leu Val			
225	230	235	240
Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly			
245	250	255	

- 106 -

His Leu Asp His Leu Glu Ala Ala Lys Ser Ala Leu Gly Lys Gly Gly
 260 265 270

Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu
 275 280 285

Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp
 290 295 300

Tyr Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys
 305 310

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 1590 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: *Sorghum bicolor* (čirok)

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

(B) KLON: pWDC-19 (NRRL B-21649)

(ix) ZNAK:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ:
- (B) POZICE: 1..1320
- (C) DALŠÍ INFORMACE: /produkt = „částečná kódující oblast protox-1 z čiroku“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

TCCACCGTCG AGCGCCCCGA GGAAGGGTAC CTCTGGGAGG AGGGTCCCAA CAGCTTCCAG 60

CCATCCGACC CCGTTCTCTC CATGGCCGTG GACAGCGGGC TGAAGGATGA CCTGGTTTTT 120

GGGGACCCCA ACGCGCCACG GTTCGTGCTG TGGGAGGGGA AGCTGAGGCC CGTGCCATCC 180
AAGCCCGCCG ACCTCCCGTT CTTGATCTC ATGAGCATCC CTGGCAAGCT CAGGGCCGGT 240
CTCGGCGCGC TTGGCATCCG CCCGCCTGCT CCAGGCCGCG AGGAGTCAGT GGAGGAGTTT 300
GTGCGCCGCA ACCTCGGTGC TGAGGTCTTT GAGCGCCTAA TTGAGCCTTT CTGCTCAGGT 360
GTCTATGCTG GCGATCCTTC CAAGCTCAGT ATGAAGGCTG CATTTGGGAA GGTGTGGCGG 420
TTAGAAGAAG CTGGAGGTAG TATTATTGGT GGAACCATCA AGACGATTCA GGAGAGGGGC 480
AAGAATCCAA AACCACCGAG GGATCCCCGC CTTCCGAAGC CAAAAGGGCA GACAGTTGCA 540
TCTTTCAGGA AGGGTCTTGC CATGCTTCCA AATGCCATCA CATCCAGCTT GGGTAGTAAA 600
GTCAAACAT CATGGAACT CACGAGCATG ACAAATCAG ATGGCAAGGG GTATGTTTTG 660
GAGTATGAAA CACCAGAAGG GGTGTTTTG GTGCAGGCTA AAAGTGTAT CATGACCATT 720
CCATCATATG TTGCTAGCGA CATTTTGCCT CCACTTTCAG GTGATGCTGC AGATGTTCTA 780
TCAAGATTCT ATTATCCACC AGTTGCTGCT GTAACGGTTT CGTATCCAAA GGAAGCAATT 840
AGAAAAGAAT GCTTAATTGA TGGGGAAGTC CAGGGTTTTG GCCAGTTGCA TCCACGTAGT 900
CAAGGAGTTG AGACATTAGG AACAATATAC AGCTCATCAC TCTTTCCAAA TCGTGCTCCT 960
GCTGGTAGGG TGTTACTTCT AACTACATA GGAGGTGCTA CAAACACAGG AATTGTTTCC 1020
AAGACTGAAA GTGAGCTGGT AGAAGCAGTT GACCGTGACC TCCGAAAAAT GCTTATAAAT 1080
CCTACAGCAG TGGACCCTTT AGTCCTTGGT GTCCGAGTTT GGCCACAAGC CATACTCAG 1140
TTCCTGGTAG GACATCTTGA TCTTCTGGAG GCCGAAAAAT CTGCCCTGGA CCAAGGTGGC 1200
TATAATGGGC TGTTCTTAGG AGGGAACAT GTTGCAGGAG TTGCCCTGGG CAGATGCATT 1260
GAGGGCGCAT ATGAGAGTGC CGCGCAAATA TATGACTTCT TGACCAAGTA CGCCTACAAG 1320
TGATGGAAGA AGTGGAGCGC TGCTTGTTAA TTGTTATGTT GCATAGATGA GGTGAGACCA 1380
GGAGTAGTAA AAGGCGTCAC GAGTATTTTT CATTCTTATT TTGTAAATTG CACTTCTGTT 1440
TTTTTTTCCT GTCAGTAATT AGTTAGATTT TAGTTATGTA GGAGATTGTT GTGTTCACTG 1500

26.08.98

- 108 -

CCCTACAAAA GAATTTTAT TTTGCATTCG TTTATGAGAG CTGTGCAGAC TTATGTAACG 1560

TTTTACTGTA AGTATCAACA AAATCAAATA 1590

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 440 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: není relevantní
- (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

Ser Thr Val Glu Arg Pro Glu Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro
1 5 10 15

Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Val Leu Ser Met Ala Val Asp Ser
20 25 30

Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe
35 40 45

Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp
50 55 60

Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly
65 70 75 80

Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Ala Pro Gly Arg Glu Glu Ser
85 90 95

Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg
100 105 110

Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys
115 120 125

Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ala

26.08.98

- 109 -

130	135	140
Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Gly		
145	150	155 160
Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly		
165	170	175
Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala		
180	185	190
Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr		
195	200	205
Ser Met Thr Lys Ser Asp Gly Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr		
210	215	220
Pro Glu Gly Val Val Leu Val Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile		
225	230	235 240
Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile Leu Arg Pro Leu Ser Gly Asp Ala		
245	250	255
Ala Asp Val Leu Ser Arg Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr		
260	265	270
Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly		
275	280	285
Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu		
290	295	300
Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro		
305	310	315 320
Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr		
325	330	335
Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg		
340	345	350
Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Thr Ala Val Asp Pro Leu Val		
355	360	365
Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly		

370	375	380
His Leu Asp Leu Leu Glu Ala Ala Lys Ser Ala Leu Asp Gln Gly Gly		
385	390	395 400
Tyr Asn Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu		
405	410	415
Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ala Gln Ile Tyr Asp		
420	425	430
Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys		
435	440	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 93 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis = „intronová sekvence protox-1 z kukuřice“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

GTACGCTCCT CGCTGGCGCC GCAGCGTCTT CTTCTCAGAC TCATGCGCAG CCATGGAATT	60
GAGATGCTGA ATGGATTTTA TACGCGCGCG CAG	93

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2606 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: *Beta vulgaris* (řepa cukrovka)

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

(B) KLON: pWDC-20 (NRRL B-21650)

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ:

(B) POZICE: 1..6

(C) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka = „místo SalI“

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ:

(B) POZICE: komplement (1..538)

(C) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka = „částečná cDNA
protox-1 z řepy cukrovky ve směru 3'-5'“

(ix) ZNAK:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ:

(B) POZICE: 539..2606

(C) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka = „oblast promotoru
protox-1 z řepy cukrovky uvedená ve směru 3'-5'
(částečná sekvence fragmentu PstI-SalI o velikosti
~ 3 kb subklonovaná z pWDC-20)“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

GTCGACCTAC GCACATGCCA CATTCCACAT TCCACGTTAG GAATTGAATT GAATTGAATT	60
ATGATTATGA ATAATGAAGA GACAGAATTA CCGCCATGGT GAGCACCGCG TCGGAAGGCT	120
GGAAGCTATT GGGTCCCTCC TCCCAGATAT AGCCATCGGC CTCCACAGTG ACGATGTTGC	180
CGCCAACTCT GTCTTTGGCC TCTGTCACTA TAAAATTTGG GGATAAAGAG GACTGTTTTG	240
TACAAAGAGC CTGCGCGATG CAAAGCCCGC TAATTCCACC TCCAACGATT ACGCAGTCTA	300
GCAATCCTCC TGCTCCTGAT CCTGATCCTG ATCCTGCTTC TTAAACCGCT GACTTTGAGC	360
CTGAGCTTGT GCTGCAACTC ATGCTCATCC TCCTCTTCTT ATGTGAATAA TAACCTCGTC	420

TTCCAATTAA ACTACATGGA ATTGACACA TGATACAATT GCCCCTGTAA TGCCCCGCTGC	480
TGTGCAATGG CATGCACTGT GTCTGTGGAA TGCAGTTTGA TAACGCCATT GATTTTCATCT	540
CTCTCTCGCT CTCTCGCCCT CCTTATCCTC TATATCCCCT TCTTGCTTGC TCGGGAATTC	600
TAATTAACCT TATATCAAAA TGAAACAACCT GTTTCTAGTT AAAAAGTTTT TTATAAATAG	660
TACTCTAAAT AAACGATTAC ATGTATCTTC TAACCATACT TGTTTGGTGG AGGTGGTGCG	720
TAACCGGTAA CTTACCTTTG TAACTCACCT CAATACCTAC TTATGCTTAA GGATACGGAT	780
TCTTTTAAAC TCTCAGGCAT TGACCTATGT AGCTGGACTG ACTAACATCT GAATTTGTTT	840
CTCTGGTTAT ATATGCAATT TTAAGTGAAT CGAAATTTCT CTGGATGCTA AAAATGTCTT	900
TAACGGGGTT TATGAGGACT AAATTATCTC CTTCAATGAG GAGGTTCTTG ATTTGCATGT	960
ATGAGCGTGA AAATGCATTC TTAACGGCTA TAGATTCAGT AATAAGTGGT GTTAAAAGTA	1020
AAAAGTACTT GGAAAAATGA TTAAGCGACT TAATTTTTTT TATTGTTTG AAAGTTGCCT	1080
TTTCTTGGCT ATCTTAACAT GTATTTATCA AACACCTTTT TTAATTACAT GGAAATCGAA	1140
AAGTTTGAAA AAAAAAATC ATACTCACTA ACCGCCTTAA AATATAAGCT GAAGATGTCT	1200
CACTAACAGA GTGCATGTGA AGCACCCCCA AAGCAATTAT AACACAACAT CTCCGCCTCT	1260
TCAAAATTCC TACAAATACA TCTAATAAAC TTGTTGAAAC AATCAAAGTA ACATGGTGTG	1320
TCAATTGCGG ATGCTTCTCA TTCCAGACTT TATATAGTGA TTTTGTTTAA TCCATAGTCA	1380
ACAACTCACA TAATGGTACC CAAAGAATAC CCAAATTTTT TGCTCAAAAT CCCTAAACAT	1440
TGTAGCTGTG TAAGTTTGAC TAACATGTTT CAGCATGCTT GCCATGGGTA AATAAGACTT	1500
AGGGGCAAAT CTCGAATCCA CAAACTCATC ATTGGTTTTA GTTTGTCTCC AACGTAAAAC	1560
AATGATGTGA AATACACCAC AAAATTCATA CAATCTCGTT ATCTTGAAG CTTGAAAGCC	1620
ATAATCTTGT TTGTACTTTC ACTACGTCGA GAAGACAAAA TTACAACTAA GAAGAGGTCA	1680
TTGCTCAGTG TCGTGTAATA CTTATCTTTC AACTCATAGA AACAAGCAAA CCAATTGTCA	1740

26.08.98

- 113 -

CCTATATACT GTACTTCTCC ATCATATACT TCCAACCTGC CTTAAACTCA ATACTATCAT	1800
AAAAACCACA AAGACATTTT ATAAAAGCAT AATAAAAATG TGTCATCACT CTTCAAAGTT	1860
CCAAAGTGAT TCTAACTACA TTCTAATGAA AATGACATTG GTGTAAACCT AATCCTTGTG	1920
TTATAAAACA CCTACATACC ACGATTATGT TAGAAATATA TTTATGAATG CAGTACCTAC	1980
ATAAAGCCAT TAAATAACCA GTTTTATGTT ATTTCTGTGAC CAACATAGTT CCTAAAGATT	2040
ACGAAGTAAT TTATAGTCAT TTTGTGGCCA CTTAATTCAT TTAATACCCA GTATATTTAT	2100
AAGTTACCAG CTTAAGTAGT TTTGTGACCA TCTCTACATA CTTCTCCCGG TCCATAATAA	2160
GGGGGCGTTT GGTTGCAACG GGGTAAAGGG AATGGAATCA AGAAAGGGAG AGGAGAGGAA	2220
AGGAAAAGAA AACCCCTAGA TTTAGAGTGG TGTTTGGTTA AGATAATGTT AATTCTCTTT	2280
CTTCTCTTTT CTTACCCTTC TTCCACCCTA GCACCACCAC TCCTCCCTCT GTTACTATTC	2340
TCCACGCCGC CTCTCCCTAC CCCAGTAACA CCACCTTGTC GGCCCCCGG TCTTCCCCTT	2400
CCGCGACGG TTCCCCCTC CCCTGCGCCG TCACGTCGTC CCCCTCACCT CCCTGCACCG	2460
TCGAGTTATC CCCCTCCCCT GCGCGTCGCG TTCTCCCCTC CCTCACCATC GCGTTCTCCC	2520
CTCCCTCACC GTCGCGTTCT CCCCTCCCTC ACCGTGCGGG TCTCCCCTCC CTCACCGTCG	2580
CGGTCTCTCT TTCCCTCCCC CTGCAG	2606

26.08.98

PV 2727-98

- 114 -

5/632

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaná molekula DNA obsahující promotor rostlinné protoporfyrinogenoxidázy (protox) nebo její funkčně shodný derivát.

2. Izolovaná molekula DNA obsahující rostlinný protox promotor, který je přirozeně spojen s kódujícími sekvencemi rostlinné protoporfyrinogenoxidázy.

3. Izolovaná molekula DNA podle nároku 2, kde rostlina je druh rodu *Arabidopsis*.

4. Izolovaná molekula DNA podle nároku 3, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 13 a všechny molekuly DNA hybridizující s ní za průměrně stringentních (přísných) podmínek.

5. Izolovaná molekula DNA podle nároku 2, kde rostlina je kukuřice.

6. Izolovaná molekula DNA podle nároku 5, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 14 a všechny molekuly DNA hybridizující s ní za průměrně stringentních (přísných) podmínek.

7. Izolovaná molekula DNA podle nároku 2, kde rostlina je řepa cukrovka.

8. Izolovaná molekula DNA podle nároku 7, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního

čísla 26 a všechny molekuly DNA hybridizující s ní za průměrně stringentních (přísných) podmínek.

9. Rekombinantní molekula DNA obsahující promotor rostlinné protoporfyrinogenoxidázy (protox) podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 nebo její funkčně shodný derivát.

10. Chimérický gen obsahující rostlinný protox promotor operativně spojený s heterologní kódující sekvencí DNA.

11. Chimérický gen podle nároku 10, kde rostlinný protox promotor je z genu protox-1.

12. Chimérický gen podle nároku 10, kde rostlinný protox promotor je z genu protox-2.

13. Chimérický gen podle nároku 10, kde protox promotor je z rostliny vybrané ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, soju, bavlník, tabák, řepu cukrovku, řepku olejku, kukuřici, pšenici, čirok, žito, oves, jálek a rýži.

14. Chimérický gen podle nároku 10, kde promotor je z rostliny vybrané ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, řepu cukrovku a kukuřici.

15. Chimérický gen podle nároku 10, kde promotor je z rostliny vybrané ze skupiny obsahující *Arabidopsis* a kukuřici.

16. Chimérický gen podle nároku 10, kde promotor je z řepy cukrovky.

17. Chimérický gen podle nároku 10, kde promotor je dlouhý alespoň 300 nukleotidů.

18. Chimérický gen podle nároku 17, kde promotor je dlouhý alespoň 500 nukleotidů.

19. Chimérický gen podle nároku 11, kde promotor je z *Arabidopsis* a má sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 13.

20. Chimérický gen podle nároku 11, kde promotor je z kukuřice a má sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 14.

21. Chimérický gen podle nároku 11, kde promotor je z řepy cukrovky a má sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 26.

22. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní kódující sekvence kóduje modifikovanou, k herbicidu rezistentní formu rostlinného enzymu.

23. Chimérický gen podle nároku 22, kde rostlinný enzym je vybrán ze skupiny obsahující imidazolglycerolfosfát-dehydratázu (IGPD), 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázu (EPSP), glutaminsyntetázu (GS), acetylkoenzym-A-karboxylázu, acetolaktátsyntázu, histidinoldehydrogenázu a proto-porfyrinogenoxidázu (protox).

24. Chimérický gen podle nároku 23, kde rostlinný enzym je protox.

25. Chimérický gen podle nároku 23, kde rostlinný enzym je eukaryotická protox mající aminokyselinovou substituci, která má tu vlastnost, že uděluje rezistenci k inhibitoru protox.

26. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein z *Arabidopsis* sp., který má aktivitu protox-1 nebo protox-2.

27. Chimérický gen podle nároku 26, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 2 nebo sekvenci identifikačního čísla 4.

28. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein z kukuřice, který má aktivitu protox-1 nebo protox-2.

29. Chimérický gen podle nároku 28, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 6 nebo sekvenci identifikačního čísla 8.

30. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein z pšenice, který má aktivitu protox-1.

31. Chimérický gen podle nároku 30, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 10.

32. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein ze soji, který má aktivitu protox-1.

33. Chimérický gen podle nároku 32, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 12.

34. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein z bavlníku, který má aktivitu protox-1.

35. Chimérický gen podle nároku 34, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 16.

36. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein z řepy cukrovky, který má aktivitu protox-1.

37. Chimérický gen podle nároku 36, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 18.

38. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein z řepky olejky, který má aktivitu protox-1.

39. Chimérický gen podle nároku 38, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 20.

40. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein z rýže, který má aktivitu protox-1.

41. Chimérický gen podle nároku 40, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 22.

42. Chimérický gen podle nároku 10, kde heterologní molekula DNA kóduje protein z čiroku, který má aktivitu protox-1.

43. Chimérický gen podle nároku 42, kde protein obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 24.

44. Rekombinantní vektor obsahující rekombinantní molekulu DNA podle nároku 9.

45. Rekombinantní vektor obsahující chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 10 až 43, přičemž vektor je schopen trvalé transformace do rostliny, rostlinných semen, rostlinného pletiva nebo rostlinné buňky.

46. Rostlinné pletivo obsahující chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 10 až 43.

47. Rostlina, obsahující chimérický gen podle kteréhokoliv z nároků 10 až 43, a její potomstvo.

48. Rostlina podle nároku 47, která je vybrána ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, cukrovník lékařský neboli cukrovou třtinu, soju, ječmen, bavlník, tabák, řepu cukrovku, řepku olejku, kukuřici, pšenici, čirok, žito, oves, travníkové a pícninové trávy, proso a rýži.

49. Rostlina podle nároku 47, která je vybrána ze skupiny obsahující *Arabidopsis*, soju, bavlník, tabák, řepu cukrovku, řepku olejku, kukuřici, pšenici, čirok, žito, oves, jélek a rýži.

50. Použití protox promotoru pro expresi k herbicidu rezistentních forem cílových proteinů herbicidu v rostlině, aby tak rostlina získala rezistenci k herbicidu.

51. Použití chimérického genu podle nároku 25 pro expresi k herbicidu rezistentního rostlinného protox proteinu, který je rezistentní k inhibitorům nemodifikovaného rostlinného protox proteinu.

52. Použití protox kódující sekvence, která sdílí dostatečnou homologii, aby hybridizovala s protox kódující sekvencí spojenou s hledaným promotorem, jako sondy.

53. Použití sekvence kódující protox podle nároku 52, kde kódující sekvence použitá jako sonda je ze stejného rostlinného druhu jako hledaný protox promotor a je to kódující sekvence přirozeně spojená s promotorem.

54. Způsob přípravy molekuly DNA obsahující úsek DNA obsahující sekvenci protox promotoru a úsek DNA kódující protox protein, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se
a) připraví nukleotidová sonda schopná specifické hybridizace s rostlinným protox genem nebo mRNA, přičemž tato sonda obsahuje souvislý úsek sekvence kódující protox protein z rostliny o délce alespoň 10 nukleotidů,
b) testují další sekvence kódující protox v populaci klonovaných fragmentů genomové DNA nebo fragmentů cDNA

z vybraného organismu pomocí nukleotidové sondy připravené podle kroku a),

c) izoluje a namnoží molekula DNA obsahující úsek DNA obsahující protox promotorovou sekvenci a úsek DNA kódující protox protein.

55. Způsob přípravy molekuly DNA obsahující úsek DNA obsahující sekvenci protox promotoru, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se

a) připraví nukleotidová sonda schopná specifické hybridizace s rostlinným protox genem nebo mRNA, přičemž tato sonda obsahuje souvislý úsek sekvence kódující protox protein z rostliny o délce alespoň 10 nukleotidů,

b) testují další sekvence kódující protox v populaci klonovaných fragmentů genomové DNA nebo fragmentů cDNA z vybraného organismu pomocí nukleotidové sondy připravené podle kroku a),

c) izoluje a namnoží molekula DNA obsahující úsek DNA obsahující protox promotorovou sekvenci.

56. Způsob izolace molekuly DNA obsahující úsek DNA obsahující sekvenci protox promotoru z jakéhokoli rostlinného protox genu v y z n a č u j í c í s e t í m, že se

a) připraví nukleotidová sonda schopná specifické hybridizace s rostlinným protox genem nebo mRNA, přičemž tato sonda obsahuje souvislý úsek sekvence kódující protox protein z rostliny o délce alespoň 10 nukleotidů,

b) testují další sekvence kódující protox v populaci klonovaných fragmentů genomové DNA nebo fragmentů cDNA z vybraného organismu pomocí nukleotidové sondy připravené podle kroku a),

c) izoluje a namnoží molekula DNA obsahující úsek DNA obsahující protox promotorovou sekvenci.

57. Zemědělský způsob, vyznačující se tím, že se užije transgenní rostlina nebo její potomstvo, přičemž transgenní rostlina obsahuje chimérický gen podle kteréhokoli z nároků 10 až 25, a to v množství dostatečném pro expresi k herbicidu rezistentních forem cílových proteinů herbicidu v rostlině, která tím získá toleranci k herbicidu.

58. Chimérický gen podle nároku 10, který navíc obsahuje signální sekvenci operativně spojenou s uvedenou molekulou DNA, a tato signální sekvence je schopna cílit protein kódovaný molekulou DNA do chloroplastu.

59. Chimérický gen podle nároku 10, který navíc obsahuje signální sekvenci operativně spojenou s uvedenou molekulou DNA, a tato signální sekvence je schopna cílit protein kódovaný molekulou DNA do mitochondrie.

60. Chimérický gen podle nároku 22, kde rostlinný enzym je vybrán ze skupiny obsahující imidazolglycerolfosfát-dehydratázu (IGPD), 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázu (EPSP), glutaminsyntetázu (GS), acetylkoenzym-A-karboxylázu, acetolaktátsyntázu a protoporfyrinogenoxidázu (protox).

61. Izolovaná molekula DNA podle nároku 3, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 13 a všechny molekuly DNA s ní hybridizující za následujících podmínek:

a) hybridizace v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS), 0,5M NaPO₄ s pH 7,0, 1mM EDTA při 50 °C, a

b) promytí ve 2x SSC, 1% SDS při 50 °C.

62. Izolovaná molekula DNA podle nároku 5, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 14 a všechny molekuly DNA s ní hybridizující za následujících podmínek:

a) hybridizace v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS), 0,5M NaPO₄ s pH 7,0, 1mM EDTA při 50 °C, a

b) promytí ve 2x SSC, 1% SDS při 50 °C.

63. Izolovaná molekula DNA podle nároku 7, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvenci identifikačního čísla 26 a všechny molekuly DNA s ní hybridizující za následujících podmínek:

a) hybridizace v 7% dodecylsulfátu sodném (SDS), 0,5M NaPO₄ s pH 7,0, 1mM EDTA při 50 °C, a

b) promytí ve 2x SSC, 1% SDS při 50 °C.