

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

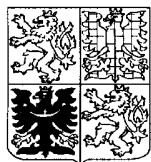
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1435-89

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07. 03. 89**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.03.88, 03.02.89**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **88/165667, 89/305566**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 12. 99**
(Věstník č. 12/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/00

(71) Přihlášovatel:

NOVARTIS AG, Basel, CH;

(72) Původce:

Ryals John, Durham, NC, US;

Montoya Alice, Durham, NC, US;

Harms Christian, Chapel Hill, NC, US;

Duesing John, Riehen, CH;

Sperisen Christoph, Basle, CH;

Meins Fred, Riehen, CH;

Payne George, Durham, NC, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby v podstatě čisté chemicky
regulovatelné DNA**

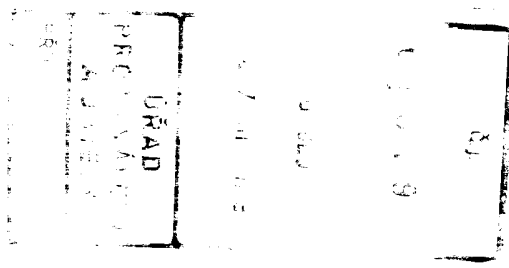
(57) Anotace:

Řešení se týká chemicky regulovatelných řetězců DNA, které mohou regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo rostlinné tkáni, chiméřní konstrukcí, které tyto řetězce obsahují, vektorů, které obsahují takové řetězce a chiméřní konstrukce transgenických rostlin a rostlinných tkání, které tyto chiméřní konstrukce obsahují. Rovněž se týká nových řetězců signálních peptidů a genů, které jsou kódem pro tyto řetězce, a nově identifikovaných genů pro bílkoviny PR. Tyto chiméřní konstrukce a transgenické rostliny a rostlinné tkáně je možno užít při sledování nových chemických regulátorů.

CZ 1435-89 A3

PV 1435-89

Int.Cl.⁴



Autor vynálezu RYALS JOHN,
MONTAYA ALICE, Durham
HARMS CHRISTIAN, Chapel Hill /US/
DUESING JOHN, Riehen
SPERISEN CHRISTOPH, Basle
MEINS FRED, Riehen /CH/
PAYNE GEORGE, Durham /US/

Majitel patentu CIBA GEIGY AG, Basilej /CH/

Název vynálezu Způsob výroby v podstatě čisté chemicky
regulovatelné DNA

Přihlášeno

/PV

Právo přednosti od 08 03 88 /165 667/

03 02 89 /305 566/

US

Vynález se týká způsobu výroby v podstatě čisté chemicky regulovatelné DNA. Zejména se týká nekódových sledů DNA, které za přítomnosti chemických regulačních prostředků mohou řídit transkripci dalších sledů DNA u rostlin.

Pokroky v technologii rekombinantní DNA a současně pokroky při transformaci a regeneraci rostlin umožnily včlenit nový genetický materiál do rostlinných buněk, rostlin nebo rostlinných tkání za vzniku nového materiálu, například fenotypů, které zvyšují hodnotu rostlin nebo rostlinných tkání. Možnosti zlepšení plodin tímto způsobem osvětlují například důkazy o geneticky získaných rostlinách, odolných proti patogenům, které byly popsány například v Evropském patentovém spisu č. 240 332 a 223 452. Rostliny, odolné proti hmyzu byly popsány v publikaci Vaeck M. a další, Nature 328, 33 (1987), produkce rostlin, odolných proti herbicidům byla popsána v publikaci DeBlock M. a další, EMBO J., 6, 2513 (1987). Cílenými rostlinami mohou být například stromy a keře, avšak také ozdobné a okrasné rostliny a polní plodiny. Je zřejmé, že pod pojmem "plodina" se může rozumět kultura rostlinné tkáně, pěstovaná v biologickém reaktoru jako zdroj určitých přírodních produktů.

V některých případech může být žádoucí řídit dobu a/nebo rozsah exprese genetického materiálu, včleňovaného do rostlin, rostlinných buněk nebo rostlinných tkání. Při ideální situaci by mělo být možné řídit expresi pomocí meziprojektu, snadno aplikovatelného na polní plodiny, okrasné keře, do biologických reaktorů a podobně. Tuto žádoucí situaci je možno poprvé realizovat podle vynálezu, který je zaměřen na systém exprese s použitím chimérického genu, regulovatelného chemicky, takže jde například o chemicky říditelný, nekódový sled DNA, který je spojen například s genem pro fenotypovou vlastnost, přičemž k expresi dochází pod řízením regulátoru například tak, že exprese takto regulovaného genu je určována přítomností nebo nepřítomností chemické regulační látky. Tento systém je prvním důkazem správnosti koncepce chemického řízení exprese chimérického genu v rostlinách nebo rostlinných tkáních. Tímto způsobem je možno získat rostliny nebo rostlinné tkáně s obsahem chimérického genu, přičemž exprese genu s uvedenými vlastnostmi je funkcí chemické regulační látky.

A. Obecný přehled technologie transformace u rostlin

V oboru jsou známy různé způsoby, kterými je možno uskutečnit genetickou transformaci rostlin a rostlinných tkání, například stálé včleňování cizorodé DNA do rostlin. Jde například o transformaci čeledi *Agrobacterium* a transformaci přímým přenosem genu.

1. Transformace, zprostředkovaná čeledí *Agrobacterium*

A. tumefaciens je příčinou onemocnění u celé řady dvouděložných a gymnospermních rostlin, vyvolává tvorbu nádorů rostlinné tkáně v místě infekce. K infekci dochází obvykle v místě, kde jsou rostliny mechanicky porušeny, *Agrobacterium* nese velkou extra-chromosomální látku, která se nazývá Ti-plasmid (tumor-inducing).

Ti-plasmidy obsahují dvě oblasti, kterých je zapotřebí pro vznik nádoru. Jednou z těchto oblastí je T-DNA (transferred-DNA), jde o sled DNA, který se stabilně přenáší do DNA genomu rostliny. Druhou oblastí, které je zapotřebí pro vznik nádoru je oblast vir (virulence), která se účastní mechanismu

přenosu. Přestože oblast vir je naprosto nezbytná pro stálou transformaci, sama se nepřenáší do infikované rostliny. Transformace rostlinných buněk působením infekce *Agrobacterium tumefaciens* s následným přenosem T-DNA je dobře dokumentována například v publikaci Bevan M. W. a Chilton M.D., Int. Rev. Genet. 16, 357 (1982)."

Po řadě let intenzivního výzkumu v celé řadě laboratoří byl systém *Agrobacterium* vyvinut natolik, že dovoluje běžnou transformaci celé řadě rostlinných tkání. Jako příklad transformovaných tkání uvedeným způsobem je možno uvést například tabák, rajče, slunečnici, bavlník, řepku, brambor a sóju. Rozsah hostitelů pro transformaci Ti-plasmidem při použití *A. tumefaciens* je poměrně široký, tabák se ukázal být nejvýhodnějším hostitelem pro snadnost manipulace.

Agrobacterium rhizogenes byl rovněž užit jako vektor pro transformaci rostlin. Tento mikroorganismus, který vyvolává tvorbu vlasovitých kořenů u celé řady čeledí dvouděložných rostlin nese velký extrachlomosomální element, který se nazývá Ri-plasmid (root-inducing), jehož funkce je podobná funkci Ti-plasmidu v *A. tumefaciens*. Transformace při použití *A. rhizogenes* byla vyvíjena obdobným způsobem jako v případě

A. tumefaciens a byla s úspěchem použita například k transformaci vojtěšky a lilku černého *Solanum nigrum* L.

2. Přímý přenos genu

Byla vyvinuta celá řada postupů s přímým přenosem genu pro transformaci rostlin a rostlinných tkání bez použití *agrobacterium*. Při přímé transformaci protoplastů může být příjem exogenního genetického materiálu do protoplastů usnadněn chemickou látkou nebo působením elektrického pole. Exogenní materiál pak může být integrován do genomu jádra. První práce byly prováděny na dvouděložných rostlinách tabáku, kde bylo prokázáno, že včleněná cizorodá DNA byla přenášena také do potomstva transformovaných rostlin, jak bylo popsáno v publikacích Paszkowski J. a další, *EMBO J.* 3, 2717 (1984) a Potrykus I. a další, *Mol. Gen. Genet.* 199, 169 (1985).

Protoplasty jednoděložných rostlin je tímto způsobem rovněž možno transformovat, k úspěšné transformaci došlo například v případě *Triticum monococcum*, *Lolium multiflorum*, u kukuřice a u sladké kukuřice (Black Mexican).

Exogenní DNA je možno do buněk nebo protoplastů včlenit také mikroinjekcí. Roztok plasmidové DNA se vstříkuje přímo do buňky jemnou skleněnou jehličkou. Tímto způsobem bylo možno transformovat protoplasty vojtěšky celou řadou plasmidů, jak bylo popsáno v publikaci Reich T. J. a další, Bio/Technology, 4, 1001 (1986).

Dalším, v poslední době vyvinutým postupem pro přímý přenos genu je bombardování buněk mikroprojektořmi, nesoucími DNA, tento postup byl popsán v publikaci Klein T.M. a další, Nature 327, 70 (1987). Při provádění tohoto postupu se urychlují částičky wolframu, povlečené exogenní DNA směrem k cílovým buňkám, což má za následek alespoň přechodnou expresi v popsaném příkladě (cibule).

B. Regenerace transformovaných rostlinných buněk

Pro transformaci rostlinných buněk existuje řada postupů, celá řada postupů však existuje také pro regeneraci rostlin z rostlinných tkání. Použitý způsob regenerace bude záviset na výchozí rostlinné tkáni a na rostlinné čeledi, která má být regenerována. V poslední době je možno regenerovat celou řadu rostlin-

ných čeledí z tkáně ²kalu^{AM}, odvozeného od rostlinných explantátů. Rostliny, které je takto možno regenerovat jsou jak jednoděložné jako kukuřice, rýže, ječmen, pšenice a žito a dvouděložné, například slunečnice, sója, bavlník, řepka a tabák.

Regenerace rostlin ze tkání, transformovaných při použití *A. tumefaciens* byla prokázána pro několik rostlinných čeledí. Šlo o slunečnici, rajče, bílý jetel, řepku, bavlník a tabák. Regenerace vojštěšky z tkáně, transformované působením *A. rhizogenes* byla rovněž úspěšná. Regenerace rostlin z protoplastů je zvláště vhodným postupem, který byl popsán například v publikaci Evans D.A. a další, v: Handbook of Plant Cell Culture, sv. 1, MacMillan Publ. Co., 1983, str. 124. V případě, že je možno regenerovat rostlinnou čeleď z protoplastů, je možno použít přímého přenosu genů a transformace přitom není závislá na použití *A. tumefaciens*. Regenerace rostlin z protoplastů byla prokázána například v případě rýže, tabáku, řepky, bramboru, okurky a kukuřice.

Technologické pokroky při transformaci rostlin a při jejich regeneraci poněkud osvětlují vysoký potenciál genetického inženýrství u plodin. Byly

již uvedeny zprávy o genetickém inženýrství u tabáku a u rostlin rajčete, které je možno učinit odolnými proti infekci, například proti viru tabákové mozaiky (TMV) a také proti různým druhům herbicidů. Odolnosti proti hmyzu bylo dosaženo v případě tabáku a rajčat.

C. Tkáňové kultury

Genetické inženýrství není omezeno pouze na polní plodiny, je možno je využít také ke zlepšení okrasných rostlin, píceň a stromů. Cílem biotechnologie rostlin, který je méně zřejmý a k němuž je možno použít jak genetického inženýrství, tak jeho aplikace na tkáňové kultury je zvýšená produkce široké škály chemických látek, odvozených od rostlin, jako jsou chuťové a vonné látky, pigmenty, přírodní sladidla, antimikrobiální látky a farmaceuticky účinné látky. Ve většině případů patří tyto sloučeniny do poměrně široké metabolické skupiny, která se společně zahrnuje pod pojem sekundárních produktů. Rostliny mohou produkovat tyto sekundární produkty s ohledem na potenciální predátory, k přitahování hmyzu, který může rostlinu opylit nebo k překonání infekce rostlin.

Kultury rostlinných buněk je možno získat ze široké škály rostlinných čeledí a je možno je pěstovat v biologických reaktorech. Typické rostlinné čeledi jsou také rostliny, které patří k těm, které produkují sekundární produkty, vzbuzující obchodní zájem. Bylo jasně prokázáno na celé řadě zemědělsky důležitých plodin, že je možno vyvolat a podrobit selekci stálé genetické změny, které byly původně zavedeny do tkáňové kultury rostlinných buněk. Velké výhody tohoto postupu spočívají v tom, že i tkáňová kultura může produkovat velké množství sekundárních látek. Tyto výhody spočívají například v (1) možnosti získání výsledného produktu s vysokou čistotou, (2) v přeměně levného prekursoru na nákladný výsledný produkt biologickou transformací a (3) v získání nových sloučenin při přivádění určitého substrátu do tkáňové kultury.

D. Výhody řízení exprese genu

Ať již je cílem genetického inženýrství polní plodina, okrasný keř, květina, strom nebo rostlinná tkáň ve formě kultury pro použití v biologickém reaktoru, hlavní výhodou řízení exprese chimérického genu je skutečnost, že k jeho expresi dochází pouze

v příslušné době a do příslušného rozsahu a v některých situacích v určitých částech rostliny. Například v případě, že má být získán žádoucí fenotyp, může být zapotřebí dosáhnout exprese chimérního genu v množství 1 % celkové bílkoviny nebo ve vyšším množství. Tak tomu je například v případě odolnosti proti houbám, kde dochází k expresi chimérní chitinázy nebo v případě odolnosti proti hmyzu, kde dochází ke zvýšené expresi inhibitoru proteinázy. V těchto případech může být energie, vynaložená na produkci vyšších množství cizorodé bílkoviny příčinou poškození rostlin, kdežto v případě, že by docházelo k expresi genu pouze v případě, že je to žádoucí, například v případě, že hrozí nákaza houbou nebo napadení hmyzem, bylo by možno snížit vynaloženou energii.

Fenotyp, k jehož expresi by docházelo na základě chimérního genu by mohl také působit na rostlinu nepříznivě v případě, že by k jeho expresi docházelo v nevhodné době v průběhu vývoje rostliny. Například v případě, že produktem chimérního genu by byl rostlinný hormon, který by indukoval opadávání ovoce, mohlo by při příliš časně expresi dojít k opadání ovoce z rostliny před dozráním semene a tím ke snížení výtěžku. V tomto případě by bylo daleko výhodnější vyvolat expresi tohoto typu genu v době, kdy opadání je žádoucí nebo méně škodlivé pro rostliny.

Pro tkáňové kultury nebo v biologických reaktorech může vést produkce sekundárního produktu v nevhodné době ke snížení rychlosti růstu kultury, což může mít za následek také snížení výtěžku hlavního produktu. Z tohoto důvodu by bylo výhodné nechat kulturu růst bez exprese sekundárního produktu a pak indukovat expresi chimérického genu v příslušnou dobu tak, aby docházelo k této expresi v nejvýhodnější době.

Na základě těchto úvah je zřejmé, že by bylo velmi žádoucí řídit dobu, rozsah a/nebo místo exprese chimérického genu v rostlinné tkáni nebo rostlinách. Toto řízení by mělo být snadno proveditelné v polních podmínkách, ve sklenících nebo v biologických reaktorech, v tomto případě by mělo velký ekonomický význam.

E. Známé rostlinné systémy pro řízení exprese genu

U některých rostlinných genů je známo, že jejich expresi je možno indukovat pomocí různých vnitřních nebo zevních faktorů včetně rostlinných hormonů, tepelného šoku, chemických látek, patogenů, nedostatku kyslíku a nedostatku světla. Několik těchto systémů bylo podrobněji popsáno, v těch, které byly až

dosud popsány nejpodrobněji vede nahromadění mRNA ke zvýšení množství specifických bílkovinných produktů.

Jako příklad řízení genu rostlinným hormonem je možno uvést tzv. abscisovou kyselinu (ABA), u níž bylo prokázáno, že je schopna u bavlníku indukovat při embryogene^sě velké množství mRNA, jak bylo popsáno v publikaci Galau G. A. a další, Plant. Mol. Biol. 7, 155 (1986). Dalším příkladem může být kyselina giberálová (GA3), která indukuje transkripty malátsyntetázy v semenech fazolí a isozym alfa-amylázy v aleuronových vrstvách ječmene, jak bylo popsáno v publikacích Rodriquez D a další, Plant Mol. Biol. 9, 227 (1987) a Nolan R. C. a další, Plant Mol. Biol. 8, 13 (1987).

Podrobněji bylo sledováno řízení genu pro bílkovinu, vznikající při tepelném šoku u soji. V případě, že rostliny byly vystaveny na několik hodin teplotě 40 °C, došlo ke tvorbě několika tzv. bílkovin tepelného šoku, které byly popsány v publikaci Key J. a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3526 (1981). Bylo izolováno několik takových genů a jejich řízení bylo podrobněji studováno. Exprese těchto genů je primárně řízena na úrovni transkripce. Promotor genu hsp70 byl spojen s genem pro neomycinotransferázu II (NptII) a chimérní gen byl zcela zřejmě indukován

tepelným šokem, jak bylo popsáno v publikaci Spena A. a další, EMBO J. 4, 2736 (1985), a to v nižší úrovni než endogenní geny pro tepelný šok.

Do další skupiny genů, které jsou v rostlinách schopny indukce náleží geny, které jsou řízeny světlem, a to zejména gen pro malou podjednotku karboxylázy ribuloso-1,5-bisfosfátu (RUBISCO). V publikacích Morelli G. a další, Nature 315, 200 (1985) a Hererra-Estrella L. a další, Nature 310, 115 (1984) bylo prokázáno, že sousední sled genu RUBISCO směrem ke 5'-zakońčení může přenášet indukovatelnost světla na další gen při spojení za vzniku chimérního útvaru. Toto pozorování bylo později potvrzeno i u dalších genů, indukovatelných světlem, jako jsou například geny pro vazbu chlorofylu a/b.

Geny pro alkoholdehydrogenázy

(adh) u kukuřice byly rovněž podrobně studovány.

Gen adh1-s z kukuřice byl izolován a bylo také prokázáno, že sousední řetězec DNA směrem k 5'-zakońčení byl schopen indukovat expresi chimérního genu, například genu pro chlormafenikolacetyltransferázu (CAT) v případě, že přechodně transformovaná tkáň byla vystavena anaerobním podmínkám, jak bylo popsáno v publikaci Howard E. a další, Planta 170, 535 (1987).

Skupina chemických látek, známých jako ochranné látky byla vyvinuta k ochraně nebo "záchrance" rostlin proti potenciální aplikaci herbicidů s následným poškozením rostlin. Obecný mechanismus působení těchto látek dosud nebyl plně objasněn, jedním z možných mechanismů je však řízení přirozeně regulovatelných genů těmito látkami. V poslední době bylo prokázáno, že vyšší množství glutathion-S-transferázy (GST) se indukuje u kukuřice při působení ochranné látky, kterou je benzylester kyseliny 2-chlor-4-(trifluormethyl)-5-methyl-thiazolkarboxylové, jak bylo popsáno v publikaci Wiegand R. C. a další, *Plant Mol. Biol.* 7,,235 (1986). Přesto že množství mRNA pro GST je při působení ochranné látky zvýšeno, nepodařilo se osvětlit mechanismus, který vede k tomuto zvýšení.

Řada rostlin, které reagují přecitlivělostí na přítomnost různých patogenů je stimulována k produkci skupiny bílkovin, vztahujících se k pathogenetické příčině (PR), tyto bílkoviny mají nízkou molekulovou hmotnost, je možné je extrahovat kyselinami a byly popsány v publikaci Van Loon L. C., *Plant Mol. Biol.* 4, 111 (1985). Zvláštní význam však má pozorování, že tyto PR bílkoviny se hromadí až do vysokého množství u rostlin, na něž se působí chemickými látkami,

například kyselinou polyakrylovou a kyselinou acetylo-salicylovou, jak bylo popsáno v publikaci Gianinazzi S. a další, J. Gen. Virol. 23, 1 (1974) a White R. F., Virology 99, 410 (1979). Přítomnost PR bílkovin byla v korelaci s indukcí místní i systemické odolnosti proti velkému počtu patogenů. Interpecifický hybrid tabáku, odolný proti viru mozaiky tabáku (TMV) měl tu vlastnost, že u něj docházelo ke konstitutivní expresi PR-bílkovin podle publikace Ahl P. a další, Plant Sci. Lett. 26, 173 (1982). Mimoto při imunoprecipitaci produktů translace in vitro při použití mRNA z tabáku, infikovaného TMV nebo zpracovaného působením chemických látek podle publikací Cornelissen B. J. C. a další, EMBO J. 5, 37 (1986) a Carr J. P. a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7999 (1985) se ukázalo, že zvýšená hladina PR-bílkovin byla důsledkem nahromadění RNA. Je tedy zřejmé, že indukce genů pro PR-bílkoviny chemickými látkami nebo patogeny je metodou, kterou by bylo možno vyřešit problém řízení exprese genu u rostlin nebo v rostlinných tkáních chemickými látkami.

Vynález se týká a) chemicky regulovatelných řetězců DNA, s výhodou ve v podstatě čisté formě, b) jednoho nebo většího počtu chemicky regulovatelných řetězců DNA v kombinaci s jednou nebo větším

počtem částí, avšak nikoliv s celým kódovým sledem, s nimž je regulovatelný sled spojen v přírodních genech, c) chimérních genů, které obsahují jeden nebo větší počet chemicky regulovatelných řetězců DNA, d) vektorů, které obsahují řetězce nebo geny, uvedené v odstavci a), b) a/nebo c), e) rostliny, semena a rostlinné tkáně, obsahující chemicky regulovatelné chimérní geny a f) chemické regulace chemicky regulovatelných chimérních genů v rostlinné tkáni. Vynález se dále týká signálního peptidů, řetězce DNA, který je kódem pro signální peptid a v podstatě čistých forem několika přírodně se vyskytujících chemicky indukovatelných genů.

Vynález se dále týká několika použití chemicky regulovatelných řetězců DNA,

- a) řízení chimérních genů v buňkách, které jsou pěstovány v biologických reaktorech,
- b) experimentálních metod pro chemické regulátory,
- c) vývoje regulace v rostlinách,
- d) regulace sterility rostlin a
- e) regulace chimérního a/nebo heterologního genu, zejména jeho exprese v transformované rostlině. Další použití bude zřejmé z následujícího podrobného popisu vynálezu.

Vynález bude osvětlen v souvislosti s přiloženými výkresy.

Na obr. 1 je znázorněn alespoň částečně systém míst pro působení restričních endonukleáz v lambda tobchrPR1013. Genom rekombinantního fágu o 49 kb je znázorněn tak, že jsou zakresleny také ramena, a to pravé a levé rameno lambda. Včleněný fragment z tabáku o 19 kb je zvětšen. Zvětšená část je znázorněna pod celým genem. Uložení genu PR-1a (čtvereček, který je čtverečkovaně vyšrafován), je znázorněn spolu se směrem transkripce, který je označen šipkou. P=Pst, H=HindIII, C=ClaI a R=EcoRI.

Na obr. 2 je znázorněna konstrukce pBS-PR1013Cla z lambda tobchrPR1013. Fragment DNA o 19 kb mezi dvěma místy pro působení ClaI byl subklonován v plasmidu Bluescript. C = ClaI, LGT agarose=agarosa, vytvářející gel při nižší teplotě.

Na obr. 3 je znázorněna konstrukce pBS-PR1013Eco z lambda tobchrPR1013. Fragment s obsahem 3,5 kb po štěpení enzymem EcoRI s obsahem genu PR-1a z lambda tobchrPR1013 byl subklonován v plasmidu Bluescript. R = EcoRI, LGT - agarosa = agarosa, vytvářející gel při nižší teplotě.

Na obr. 4 je znázorněna konstrukce pBS-PR1013Eco z pBS-PR1013Cla. Fragment po štěpení EcoRI s obsahem 3,6 kb, nesoucí gen PR-la je subklonován v místě působení plasmidu Bluescript pro enzym EcoRI. C = ClaI, R = EcoRI, LGT agarose = agarosa, vytvářející gel při nižší teplotě.

Na obr. 5 je znázorněna konstrukce pBS-PR1013EcoΔPst z pBS-PR1013Eco. Fragment o velikosti 600 bp po štělení enzymem Pst I je z pBS-PR1013Eco vypuštěn. P = PstI, R = EcoRI, X = XhoI, S = SalI a LGT agarose = agarosa, vytvářející gel při nižší teplotě.

Na obr. 6 je znázorněna konstrukce pBS-PR1013EcoΔPstΔXho z pBS-PR1013EcoΔPst. Plasmid o 2 kb po štěpení enzymem XhoI je z plasmidu pBS-PR1013-EcoΔPst vypuštěn. R = EcoRI, P = PstI, X = XhoI, S = SalI, a LGT agarosa = agarosa, vytvářející gel při nižší teplotě.

Na obr. 7 je znázorněna konstrukce plasmidu pCIB270 z pBI101.3 a pBS-PR1013EcoΔPstΔXho. Fragment po štěpení enzymy PstI a XhoI, obsahující část genu PR-la a sousední sled směrem k zakončení 5' je subklonován v plasmidu pBI101.3, rozštěpeném SalI-BamHI. Místa XhoI a SalI jsou kompatibilní a v případě jejich vazby dochází k vymizení příslušných míst působení uve-

dených enzymů. Místo PstI se adaptuje do místa působení BamHI při použití molekulárního adaptoru. X = XhoI, P = PstI, (X/S) = místo spojení míst po působení enzymů XhoI a SalI. V tomto místě již nemůže působit žádný enzym. LB = T - DNA, a to levý okraj, RB = T - DNA, pravý okraj. Směr transkripce od PR-la indukovatelné oblasti je znázorněn šipkou na pCIB270. Vykřížkovaná oblast v plasmidu pCIN270 znamená 3'-zakončení genu NOS. Tmavší úsek pCIB270 označuje gen pro beta-glukuronidázu. Čtveřečková část plasmidu pCIB270 znamená gen pro neomycin-fosfortransferázu II. Proužkovaná část plasmidu pCIB270 znamená promotor NOS.

Na obr. 8 je znázorněna konstrukce M13mpl8-PR1014EcoAPstAXho a M13mpl9-PR1013EcoAPstAXho. Fragment PstI-Asp-718, který obsahuje část kódového sledu PR-la a sousední sled směrem k 5'-zakončení se subklonuje z pBS-PR1013EcoAPstAXho do M13mpl8 nebo 19 po rozštěpení na Asp718-PstI. R = EcoRI, H = HindIII, P = PstI, K = KpnI (Asp718 je isischizomer KpnI), LGT agarose = agarosa, vytvářející gel při nižší teplotě.

Na obr. 9 je znázorněn postup přeměny kodonu ATG v PR-la na místo působení NcoI. DNA s jednoduchým řetězcem z M13mpl8-PR1013EcoAPstAXho je znázorněna nepřerušovanou čarou. Řetězec TCATGG se převede na CCATGG cílenou mutagenesou. K = KpnI, X = XhoI, B = BstEII, P = PstI.

Na obr. 10 je znázorněna konstrukce plasmidu pCIB268. Fragment BstEII-PstI, odvozený od replikativní formy M13mpl8-PR1013EcoAPstAXho.Nco je subklonován do pBS-PR1013EcoAPstAXho po štěpení BstEII-PstI za vzniku pCIB268. X = XhoI, B = BstEII, N = NcoI, P = PstI.

Na obr. 11 je znázorněna konstrukce pCIB269 z pBS-GUS1,2 a pCIB268. X = XhoI, N = NcoI, P=PstI. Vykřížkovaná oblast pCIB269 označuje řetězec genu GUS a tmavší úsek označuje řetězec, odvozený od genu PR-1a.

Na obr. 12 je znázorněna konstrukce plasmidu pBS-GUS1.2. Tento plasmid vzniká trojnásobnou vazbou fragmentů, odvozených od pRAJ265, pBI221.1 a plasmidu pBuluescript. S = SalI, R = EcoRI, N = NcoI.

Na obr. 13 je znázorněna konstrukce plasmidu pCIB271 z pCIB269 a pCIB200. X = XhoI, N = NcoI, R = EcoRI, S = SalI, (S/X) = spojené místo působení enzymů SalI a XhoI, LGT agarosa = agarosa, vytvářející gel při nižší teplotě.

Na obr. 14 je znázorněna mapa působení restričních endonukleáz v plasmidu pCIB219. Tento plasmid je zkonstruován přidáním adaptoru EcoRI/XhoI k fragmentu pCIB269 Xho/EcoRI, který obsahuje geny PR-1 a GUS s následným navázáním do plasmidu pCIB712 po rozštěpení enzymem SalI.

Na obr. 15 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB272. Tento plasmid je zkonstruován tak, že se naváže fragment po štěpení enzymy Asp718I/BamHI z plasmidu pCIB282, obsahující gen PR-1/GUS (-833 až +1 z PR-1a) do plasmidu pCIB200, rozštěpeného enzymy Asp718I/BamHI.

Na obr. 16 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB273. Tento plasmid se získá tak, že se uloží fragment po štěpení enzymy Asp718I/BamHI z plasmidu pCIB283 s obsahem genu PR-1/GUS (-603 až +1 z PR-1a) do plasmidu pCIB200 po jeho rozštěpení Asp718I/BamHI.

Na obr. 17 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB1004. Tento plasmid se získá tak, že se uloží fragment po štěpení enzymy XhoI/NcoI z plasmidu pCIB269, obsahujícího promotor PR-1a spolu s genem BT z pCIB10/35Bt (607) do plasmidu pCIB710 po rozštěpení enzymy SalI/BamHI jako fragment NcoI/BamHI.

Na obr. 18 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz plasmidu pCIB200/PR1-BT. Tento plasmid byl zkonstruován z plasmidu pCIB1004 a z plasmidu pCIB200.

Na obr. 19 je znázorněna mapa působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB1207. Fragment 5,8 kb XbaI genomu klonu lambda s obsahem genu Arabidopsis AHAS se klonuje v plasmidu Bluescript po jeho rozštěpení enzymem XbaI.

Na obr. 20 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB1216. Fragment 3,3 kb NcoI/XbaI z plasmidu pCIB1207 se klonuje v plasmidu pCIB269 po jeho rozštěpení enzymy NcoI a XbaI k odstranění genu GUS.

Na obr. 21 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB1233. Fragment 4,2 kb KpnI/XbaI se izoluje z plasmidu pCIB1216 a uloží se do plasmidu pCIB200 po jeho rozštěpení enzymy KpnI a XbaI.

Na obr. 22 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pBSGluc39.1/~~GUS~~. Fragment o 1462 bp z plasmidu pBSGluc39.1 se klonuje v pBS-GUS1.2 po jeho rozštěpení enzymy NcoI a KpnI.

Na obr. 23 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz z pCIB200/Gluc39.1-GUS. Fragment KpnI/XbaI s obsahem promotoru β -glukanázy a genu GUS se izoluje z plasmidu pBSGluc39.1/GUS a uloží se do pCIB200 po štěpení KpnI a XbaI.

Na obr. 24 je znázorněna mapa míst působení restričních endonukleáz v plasmidu pCIB200/Gluc39.1-BT. Fragment KpnI/NcoI z plasmidu pCIB1004 s obsahem genu BT a fragment KpnI/NcoI z plasmidu pBSGluc39.1/GUS a pCIB200 po štěpení KpnI a po působení alkalické fosfatázy z telecího brzlíku se naváží.

Na obr. 25 je znázorněna mapa míst působení restričních endonukleáz plasmidu pBSGluc39.1/AHAS, zkonstruovaného z fragmentu NcoI/XbaI plasmidu pBSGluc39.1/GUS a 3,3 kb NcoI/XbaI fragmentu z plasmidu pCIB1207 s obsahem genu AHAS.

Na obr. 26 je znázorněna mapa míst působení restričních endonukleáz v pCIB200/Gluc39.1-AHAS. Fragment KpnI/XbaI, obsahující promotor β -glutanázy a gen AHAS se izoluje z plasmidu pBSGluc39.1/AHAS a uloží se do plasmidu pCIB200, rozštěpeného KpnI a XbaI.

Na obr. 27 je znázorněna mapa míst působení restričních endonukleáz v pBSGluc39.3/GUS. Fragment o 1677 bp z plasmidu pBSGluc39.3 se klonuje v plasmidu pBS-GUS1.2 po štěpení NcoI a KpnI.

Na obr. 28 je znázorněna mapa míst působení restričních endonukleáz v pCIB200/Gluc39.3-GUS. Fragment kpnI/XbaI, obsahující promotor β -glukanázy a gen GUS se izolují z plasmidu pBSGluc39.3/GUS a uloží se do pCIB200 po štěpení KpnI a XbaI.

Na obr. 29 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v pCIN200/Gluc39.3-BT. Fragment KpnI/NcoI z plasmidu pCIB1004, obsahující gen BT, fragment KpnI/NcoI z plasmidu pBSGluc39.3/GUS a plasmid pCLB200, rozštěpený KpnI se po zpracování alkalickou fosfatázou z telecího brzlíku podrobí vzájemné vazbě.

Na obr. 30 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v pBSGluc39.3/AHAS, který byl zkonstruován z fragmentu NcoI/XbaI plasmidu pBSGluc39.3/GUS a 3,3 kb NcoI/XbaI fragmentu z plasmidu pCIB1207 s obsahem genu AHAS.

Na obr. 31 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v pCIB200/Gluc39.3-AHAS. Fragment KpnI/XbaI s obsahem promotoru 8-glukanázy a gen AHAS se izolují z plasmidu pBSGluc39.3/AHAS a uloží se do plasmidu pCIB200 po štěpení KpnI a XBAI.

Na obr. 32 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB1208. Fragment 5,8 kb XbaI klonu genomu lambda s obsahem mutovaného genu Arabidopsis AHAS se klonuje do plasmidu Bluescript v místě působení restrikční endonukleázy XbaI.

Na obr. 33 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB1230.

Fragment 3,3 kb NcoI/XbaI z plasmidu pCIB1208 se klonuje v plasmidu pCIB269 po jeho rozštěpení NcoI a XbaI k odstranění genu GUS.

Na obr. 34 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v plasmidu pCIB1232. Fragment 4,2 kb KpnI/XbaI se izoluje z plasmidu pCIB1230 a uloží se do plasmidu pCIB200 po jeho rozštěpení enzymy KpnI a XbaI.

Na obr. 35 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v pBSGluc39.1/AHAS-SuR, Tento plasmid byl zkonstruován z fragmentu NcoI/XbaI plasmidu pBSGluc39.1/GUS a fragmentu 3,3 kb NcoI/XbaI z plasmidu pCIB1208 s obsahem genu AHAS.

Na obr. 36 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v pCIB200/Gluc39.1-AHAS-SuR. Fragment KpnI/XbaI s obsahem promotoru β -glukanázy a gen AHAS se izolují z plasmidu pBSGluc39.1/AHAS-SuR a uloží se do plasmidu pCIB200 po jeho rozštěpení enzymy KpnI a XbaI.

Na obr. 37 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v pBSGluc39.3/AHAS-SuR, postupuje se tak, že se naváže fragment NcoI/XbaI z plasmidu pBSGluc39.3/GUS a fragment 3,3 kb NcoI/XbaI z plasmidu pCIB1208 s obsahem genu AHAS.

Na obr. 38 je znázorněna mapa míst působení restrikčních endonukleáz v pCIB200/Gluc39.3-AHAS-SuR. Fragment KpnI/XbaI, obsahující promotor β -glukanázy a gen AHAS se izolují z p-BSGluc39.3/AHAS-SuR a uloží se do plasmidu pCIB200 po jeho rozštěpení působením enzymu KpnI a XbaI.

Krátký popis řetězců

Řetězec 1 uvádí sled DNA genomu fragmentu od 2 kb mezi místy působení enzymu XhoI a BglII genu PR-1a tabáku. Šipka u nukleotidu 903 označuje počátek transkripce, vertikální šipky v polohách 207 a 313 identifikují konce dvou nezávislých klonů cDNA. Je rovněž uveden polypeptidový řetězec, pro nějž je kódem kódová část genu.

Řetězec 2 uvádí sled DNA genomu genu tabáku PR-1' a řetězec aminokyselin polypeptidu, pro nějž je kódem kódová oblast genu.

Řetězec 3 uvádí sled cDNA pro PR chitinázu okurky a řetězec aminokyselin v polypeptidu, pro nějž je kódem kódová oblast genu.

Řetězec 4 uvádí sled cDNA hlavní formy genu PR-R tabáku a (4a) uvádí jak řetězec (4),

tak řetězec aminokyselin v polypeptidu, pro nějž je kódem kódová oblast genu.

Řetězec 5 uvádí sled DNA genomu základního genu pro β -1,3-glukanázu tabáku, tak jak je obsažen v klonu pBSGluc39.1.

Řetězec 6 uvádí sled DNA genomu, a to základního genu pro β -1,3-glukanázu tabáku, tak jak je obsažen v klonu pBSGluc39.3.

Řetězec 7 obsahuje sled cDNA genu PR-Q tabáku, tak jak je obsažen v plasmidu pBSchl5.

Řetězec 8 uvádí sled DNA, a to izolované cDNA, obsažené v plasmidu pBSGL6e. Tato cDNA je kódem pro kyselou formu β -1,3-glukanázy.

Vynález popisuje izolaci, klonování a identifikaci řetězců DNA, které jsou schopné řídit transkripci řetězce DNA v rostlinné tkáni, přičemž toto řízení je závislé na chemickém regulátoru. Tyto řetězce DNA mohou být využity ke konstrukci chimérních genů, v nichž je možno expresi genu řídit uvedenými regulátory. Při schopnosti regulovat expresi chimérního genu v transgenní rostlině chemickým způsobem je vhodné dosáhnout exprese fenotypického jevu s co nejmenším nepříznivým účinkem na růst a vývoj rostliny. Tato regulace je důležitá při výrobě sekundárních produktů nebo jiných

klonovaných produktů v rostlinné tkáni v kultuře nebo v biologickém reaktoru. Řízení klonovaného sledu je rovněž důležité při řízení jiných produktů genu.

Exprese daného kódového sledu v jakémkoliv určeném čase může být řízena chemickým regulátorem, jímž se působí na rostlinnou tkáň. Geny, které se účastní řízení určitých přechodných vývojových stupňů je také možno regulovat spojením s chemicky regulovatelným řetězcem A, který se naváže na příslušný kódový sled DNA. Tímto způsobem je možno udržet vývoj rostliny na určitém stupni nebo je možno jej urychlit tím, že se množství chemické regulační látky sníží nebo zvýší.

Chemicky regulovatelné řetězce DNA je možno využít k řízení exprese cizorodých genů, které přenáší například odolnost proti herbicidům nebo toleranci vůči nim, například toleranci vůči atrazinu u sóji, stejným způsobem je možno přenášet také odolnost proti hmyzu, například u bavlníku odolnost proti krystalické bílkovině *Bacillus thuringiensis* nebo je možno dosáhnout specifické selektivní exprese, jako je tomu v případě samičí nebo samčí sterility. Chemicky regulovatelné řetězce DNA je možno využít také k řízení transkripce řetězce DNA a tím i k řízení exprese druhého kódového sledu.

Způsobem podle vynálezu je tedy možno dosáhnout celé řady cílů:

- a) především je možno konstruovat chimérní geny, jejichž expresi v rostlinné tkáni je možno řídit chemickým regulátorem,
- b) Dále je možno získat v podstatě čisté, chemicky regulovatelné řetězce DNA, schopné řídit genetickou účinnost jiných řetězců DNA v rostlinné tkáni v důsledku účinku chemických regulátorů.
- c) Je možno získat chemicky regulovatelné řetězce DNA v kombinaci s částí, avšak nikoliv s celou délkou jakéhokoliv kódového řetězce DNA, s nímž jsou tyto řetězce spojeny v přírodně se vyskytujících genech.
- d) Je možno získat vektory s obsahem chemicky regulovatelných řetězců DNA s obsahem nebo bez obsahu dalších částí přírodně se vyskytujících genů, v nichž se mohou vyskytovat.
- e) Je možno získat vektory, které obsahují svrchu uvedené chimérní geny.
- f) Je možno získat rostlinné tkáně, rostliny a semena, odvozená od buněk, které byly transformovány uvedenými vektory.

- g) Je navržen způsob chemického řízení exprese kódového řetězce DNA, spojeného s chemicky regulovatelným řetězcem DNA, například k řízení fenotypického jevu.
- h) Je navržen způsob identifikace nových chemických regulátorů při použití chimérních genů a rostlinných tkání, které tyto geny obsahují.
- i) Je možno získat signální peptidové řetězce v bílkovinných, pro něž jsou kódem chemicky regulovatelné geny.
- j) Je možno získat v podstatě čisté geny pro bílkoviny, spojené s pathogenetickými pochody.

Další možnosti, které vynález poskytuje, budou zřejmé z následujícího popisu.

Definice

Aby bylo možno zajistit porozumění následujícího popisu a předmětu vynálezu, budou dále vysvětleny jednotlivé pojmy, které jsou v podlohách přihlášky používány.

"Protismyslný" mechanismus

Mechanismus pro regulaci genů, který je založen na řízení míry translace mRNA na bílkovinu

vzhledem k přítomnosti molekuly RNA v buňce, která je komplementární s alespoň částí mRNA, k jejíž translaci dochází.

Sdružený řetězec DNA

Jde o řetězec DNA, jehož účinnost spočívá v tom, že buď 1) řídí účinnost jiného řetězce DNA nebo 2) je jiným řetězcem DNA řízen. Tato definice není sice omezena, avšak zahrnuje zvláště ty řetězce, které fyzikálním způsobem sousedí v kontinuálním řetězci DNA nebo které jsou fyzikálně odděleny. Pod fyzikálním oddělením se rozumí například určitá vzdálenost v téže řetězci DNA, uložení v jiném řetězci DNA nebo diskontinuální rozložené sledy v jednom řetězci, například střídání řiditelného a kódového sledu.

Chemicky regulovatelný řetězec DNA

Řetězec DNA, který je schopen regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v závislosti na chemickém regulátoru. Tento řetězec může být přírodního nebo syntetického původu.

Chemicky regulovatelný gen

Gen, který obsahuje alespoň jeden nekódový chemicky regulovatelný řetězec DNA a alespoň jeden sdružený kódový řetězec DNA. Tyto geny mohou být přírodního původu, syntetického původu nebo částečně přírodního a částečně syntetického původu.

Chemický regulátor

Pod tímto pojmem se rozumí regulátor pro chemicky regulovatelný nebo řiditelný řetězec DNA. Jde o látku typu prvku nebo molekuly, která řídí, tj. například působí iniciací, ukončení, zvýšení nebo snížení přímým nebo nepřímým účinkem, jde o vliv na chemicky regulovatelný řetězec DNA v systému, v němž se chemický regulátor za obvyklých podmínek nenachází v účinné formě v množství, které je dostatečné k uskutečnění regulace transkripce, do stupně a v požadované době, jde o změnu transkribovatelného řetězce DNA, sdruženého s chemicky regulovatelným řetězcem DNA. Tato terminologie má zahrnovat situace, v nichž je v době, kdy je požadována transkripce přítomno jen malé množství regulátoru nebo regulátor není přítomen vůbec a situace, v nichž

je určité množství regulátoru přítomno, avšak je zapotřebí nižší nebo vyšší regulace, aby bylo možno uskutečnit podle požadavků větší nebo menší míru transkripce.

To znamená, že v případě, že systém, obsahující chemicky regulovatelný řetězec DNA je rostlina, například transgenická rostlina, chemický regulátor je látka, která se v této rostlině za obvyklých podmínek nenachází v množství, dostatečné k dosažení chemické regulace, tj. transkripce sdruženého genu do požadovaného stupně v požadované době.

Pod pojmem "přímý účinek" se rozumí, že účinek chemického regulátoru je výsledkem přímé interakce mezi chemickým regulátorem a řetězcem DNA. Pod pojmem "nepřímý účinek" se rozumí, že účinek regulátoru vzniká v důsledku přímé interakce mezi chemickým regulátorem a některou jinou endogenní nebo exogenní složkou systému, přičemž posledním důsledkem je aktivace nebo potlačení aktivity řetězce DNA. Pod pojmem "účinná forma" se rozumí, že chemický regulátor je ve formě, v níž se má nacházet k dosažení řízení.

Chimérní řetězec nebo gen

Jde o řetězec DNA, který obsahuje alespoň dvě heterologní části, například části, odvozené

od přírodně se vyskytujících řetězců DNA, které nejsou sdruženy nebo spojeny v místech svého přírodního spojení, nebo obsahuje řetězec alespoň jednu část, která je syntetického původu a přírodně se nevyskytuje.

Kódový řetězec DNA

Jde o řetězec DNA, který po transkripci a translaci dává vznik tvorbě buněčného polypeptidu.

Gen

Odlišitelná chromosomální oblast, která dává vznik odlišitelnému buněčnému produktu.

Nekódový řetězec DNA

Jde o řetězec DNA, při jehož transkripci a translaci nedochází ke tvorbě buněčného polypeptidu při sdružení nebo spojení s určitým kódovým sledem DNA. Jde například o řetězec, který při spojení s kódovým řetězcem jiného původu nebo nekódovým řetězcem se může stát řetězcem kódovým.

Fenotypický jev

Pozorovatelná vlastnost, která je důsledkem exprese určitého genu.

Rostlinná tkáň

Jakákoliv tkáň rostliny v přírodě nebo ve tkáňové kultuře. Tento pojem zahrnuje, avšak není omezen na celé rostliny, rostlinné buňky, rostlinné orgány, semena rostlin, protoplasty, kalus, buněčné kultury a jakékoliv skupiny rostlinných buněk, organizované do strukturních a/nebo funkčních jednotek. Použití tohoto pojmu ve spojení s určitým typem rostlinné tkáně nebo bez tohoto spojení nemá být myšleno výlučně pro jakýkoliv typ rostlinné tkáně.

PR nebo-li bílkoviny, spojené s pathogenotickými jevy

Jde o bílkoviny, k jejichž expresi dochází u rostlin, které reagují hypersensitivně vůči patogenům. Tento termín zahrnuje, avšak není omezen na kyselé a zásadité formy bílkovin tabáku PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-1', PR-2, PR-N, PR-O, PR-P, PR-Q, PR-S, PR-R, chitinázy, která je základním odpovídajícím partnerem PR-P nebo PR-Q a β -1,3-glukanázy (glukan endo-1,3- β -

-glukosidáza, EC 3.2.1.39), která je základní součástí PR-2, PR-N nebo PR-O, jakož i pathogenem indukovatelná chitináza u okurek. Hypersensitivní reakce je charakterizována místním odumřením tkání, které bezprostředně obklopují místo infekce pathogenem s následnou lokalizací pathogenu, která kontrastuje se sensitivní reakcí, při níž se pathogen dostává do celé rostliny. Těmito patogeny mohou například být viry nebo viroidy, například virus mozaiky tabáku nebo okurky, nekrotické viry, viry, napadající listy pelargonií, červený jetel, rajčata a podobně, dále houby, například *Phytophthora parasitica* nebo *Peronospora tabacina*, bakterie, například *Pseudomonas syringae* nebo *Pseudomonas tabaci* nebo roztoči, například *Myzus persicae*. Tyto organismy jsou uváděny pouze jako příklad a nejsou v žádném smyslu vyčerpávajícím seznamem možností.

Regulace

Zvýšení (indukce) nebo snížení (represe) úrovně exprese genu nebo úrovně transkripce řetězce DNA. Tento pojem není určen k zahrnutí jakéhokoli specifického mechanismu.

V podstatě čistý řetězec DNA

Jde o řetězec DNA, izolovaný ve podstatě čisté formě z přírodního nebo nepřírodního zdroje. Takový sled se může objevit v přírodním systému, například v bakteriích, virech nebo rostlinných nebo živočišných buňkách nebo může být získán syntetickým způsobem nebo jako řetězec cDNA. V podstatě čisté řetězce DNA se obvykle izolují ve formě vektoru, který obsahuje uvedený řetězec. Pod pojmem "v podstatě čistý" se rozumí, že jiné řetězce DNA jsou přítomny pouze v malých množstvích, například méně než 5 %, méně než 1 % nebo s výhodou méně než 0,1 %. V podstatě čisté řetězce DNA a vektory, které je obsahují, mohou být v roztoku, například ve vodném roztoku s obsahem pufrů, nebo v obvyklých živných prostředích.

Podstatná homologie řetězce

Podstatná homologie řetězce znamená blízkou strukturní příbuznost mezi řetězcí nukleotidů nebo aminokyselin. Například v podstatě homologní DNA může být homologní na 80 %, s výhodou na 90 % nebo 95 %, avšak typicky na 50 % nebo více. Homologie rovněž zahrnuje takovou příbuznost, při níž jeden nebo několik

nebo kratší řetězce nukleotidů nebo aminokyselin chybí nebo kratší řetězce s přídatnými nukleotidy nebo aminokyselinami, včleněné do homologního sledu.

A. Chemicky regulovatelné řetězce DNA

Vynález se týká nekódových řetězců DNA, které jsou schopné řídit za působení chemických regulátorů transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni. Specificky se vynález týká nekódového řetězce DNA, schopného regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo rostlinné tkáni, přičemž tato regulace je závislá na chemickém regulátoru. S výhodou existuje řetězec DNA ve v podstatě čisté formě v genu nebo genomu, v němž se nacházejí v případě, že jde o přírodní zdroj, nebo vzhledem ke směsi DNA v případě, že běží o syntetickou směs.

Nekódové chemicky regulovatelné řetězce DNA podle vynálezu jsou s výhodou takové řetězce, které v případě sdružení s kódovým řetězcem DNA regulují expresi kódového sledu v rostlinné tkáni, přičemž rozsah tohoto řízení závisí na chemickém regulátoru. Takové řetězce je možno syntetizovat nebo je možno je odvodit (například izolovat nebo klonovat) z přírodně

se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu. Chemicky regulovatelné řetězce DNA podle vynálezu nejsou omezeny pouze na rostlinnou tkáň, což znamená, že mohou být odvozeny od celé řady přírodních zdrojů, například také bakterií, virů nebo živočichů. Je možno je izolovat například od 5'- zakončení nebo 3'-zakončení přírodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu. Mimoto je možno nekódový řetězec DNA také chemicky syntetizovat nebo syntetizovat enzymaticky jako cDNA nebo jako řetězec, který má podstatnou homologii s izolovaným řetězcem. Klonováním chemicky regulovatelného nekódového řetězce DNA je možno oddělit tento řetězec od jiných řetězců, které s ním sousedí v přírodně se vyskytujícím genu. Tímto způsobem je možno získat řetězec DNA ve v podstatě čistém stavu.

V souvislosti s vynálezem zahrnuje regulace chemické regulátory, které buď způsobují indukci nebo represi. Příkladem chemicky potlačitelných genů, to znamená genů, jejichž exprese je potlačena chemickou látkou, způsobující represi, mohou být například geny typu TrpR nebo AroH, v jejichž případě přidání represoru tryptofanu nebo tryptofanu jako takového způsobuje represi exprese těchto genů. Existuje ještě řada dalších genů, které je možno tímto způsobem regulovat za represe tvorby výsledného produktu, v každém z těchto případů

účinkuje výsledný produkt tak, že způsobuje represi exprese genu. Vynález zahrnuje regulovatelné úseky těchto genů jako takové i jako součást chimérních konstrukcí, které mohou být chemicky regulovány na transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni. Příkladem chemicky indukovatelných genů, to znamená genů, jejichž exprese je indukována chemickým regulátorem, jsou geny pro bílkoviny PR, zejména geny pro tyto bílkoviny u tabáku, jako geny PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-1', PR-Q, PR-T a PR-S, gen pro chitinázu u okurky a geny pro zásaditou a kyselou β -1,3-glukanázu u tabáku. Vynález se zejména týká v podstatě čistého řetězce DNA, který je homologní nebo má podstatnou homologii s nekódovým, chemicky regulovatelným řetězcem DNA, který je částí přírodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu, například chemicky se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu v rostlině nebo rostlinné tkáni jednoděložných, dvouděložných nebo gymnospermních. S výhodou je takový řetězec DNA schopný regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž tímto sdruženým řetězcem DNA je kódový řetězec. Transkripci tohoto řetězce DNA je možno řídit chemickým regulátorem pro represi nebo pro indukci. Řetězce DNA, které spadají zvláště do úvahy, jsou ty řetězce, v nichž chemicky regulovatelným genem je gen pro bílko-

vinu PR, zvláště z dvouděložných rostlin, například tabáku nebo okurky. Nejvýhodnější jsou řetězce DNA, v nichž chemicky regulovatelným genem je gen tabáku PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-1', PR-Q nebo PR-R, gen pro chitinázu okurky nebo gen pro zásaditou nebo kyselou β -1,3-glukanázu, zvláště gen tabáku PR-1a a PR-1', avšak také gen pro chitinázu okurky nebo gen pro zásaditou a kyselou β -1,3-glukanázu tabáku. Zejména padají v úvahu takové řetězce DNA, v nichž regulovatelným genem je gen PR-1a tabáku nebo gen pro zásaditou β -1,3-glukanázu.

Chemicky indukovatelné řetězce DNA výhodného genu PR a příbuzných genů se vyskytují jako nekódové řetězce, které sousedí s kódovým řetězcem ve směru k 5'-zакončení. Jako příklad je možno uvést řetězec, izolovaný z fragmentu o přibližně 6500 párů bazí tabákového genu PR-1a, který obsahuje část kódové oblasti, přičemž oblast od 900 do 1200 párů bazí, přirozeně se vyskytující směrem k počátku transkripce je chemicky indukovatelná. Indukovatelnost se uchovává ve fragmentu, obsahujícím 500 až 700 párů bazí, který přirozeně sousedí s počátkem transkripce. Nejvýhodnější jsou tedy řetězce DNA, které se nacházejí v 5'-oblasti od PR a příbuzných genů, například v řetězci o 1200 párech bazí od počátku transkripce.

Vynález se dále týká nekódového řetězce DNA a způsobu výroby tohoto nekódového řetězce, schopného regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž tato regulace je závislá na chemickém regulátoru. Vynález se rovněž týká způsobu výroby řetězců DNA s podstatnou homologií s těmito nekódovými řetězci, způsob spočívá v tom, že se DNA buď izoluje z přírodně se vyskytujícího genu ve v podstatě čisté formě nebo se syntetizuje chemicky nebo enzymaticky.

Vynález zvláště zahrnuje způsob výroby v podstatě čistého chemicky regulovatelného řetězce DNA z chemicky regulovatelného genu v přírodně se vyskytujícím systému, který tento gen obsahuje tak, že se

- a) aktivuje exprese uvedeného systému RNA z chemicky regulovatelného genu,
- b) tato RNA se izoluje,
- c) diferenciálně se sleduje sestava genů v genomu, vznikajícím z RNA, izolované z uvedeného aktivovaného systému a RNA, izolované z kontrolního systému, který nebyl aktivován,
- d) izoluje se klon genu,

- e) z tohoto klonu genomu se podrobí subklonování chemicky regulovatelný gen a
- f) požadovaný chemicky regulovatelný řetězec DNA se izoluje.

Mimoto zahrnuje vynález podobný postup, v němž uvedeným systémem je rostlina, a který probíhá tak, že se

- a) v uvedené rostlině aktivuje exprese polyA+RNA z chemicky regulovatelného genu,
- b) tato polyA+RNA se izoluje,
- c) z uvedené polyA+RNA se konstruuje sestava cDNA,
- d) diferenciálnímu sledování se podrobí tato sestava cDNA a srovnává se s cDNA, získanou z RNA v kontrolní rostlině, která nebyla aktivována,
- e) izolují se klony cDNA, které jsou chemicky regulovatelné,
- f) izoluje se klon genomu ze sestavy genomu uvedené rostliny, přičemž jako sonda se užije klon cDNA, získaný ve stupni e),
- g) chemicky regulovatelný gen z uvedeného klonu genomu se podrobí subklonování a
- h) chemicky regulovatelný řetězec DNA se izoluje.

Výhodný je takový postup, v němž chemicky regulovatelným genem je chemicky indukovatelný gen, například gen pro bílkovinu PR, například gen tabáku PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-1', PR-Q, nebo PR-R, gen pro chitinázu okurky nebo gen pro zásaditou nebo kyselou β -1,3-glukanázu tabáku. Dále je výhodný takový postup, v němž je gen pro bílkovinu PR aktivován ve stupni a) chemickým induktorem nebo pathogenem.

Vynález se dále týká v podstatě čisté DNA, která byla připravena svrchu uvedenými postupy.

B. Chemicky regulovatelné řetězce DNA s částmi přírodně se vyskytujícími kódovými sledy

Kromě úplně nekódových chemicky regulovatelných řetězců DNA, které byly popsány svrchu v odstavci A, poskytuje vynález také nekódové řetězce DNA přírodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného řetězce DNA ve spojení s částí, avšak nikoliv s celým kódovým sledem, s nímž je regulovatelný řetězec sdružen nebo spojen v přírodně se vyskytujícím genu. Vynález zvláště zahrnuje, s výhodou v podstatě v čisté formě

řetězec DNA, který obsahuje první složku řetězce DNA, kterou je nebo s níž má podstatnou homologii nekódový chemicky regulovatelný řetězec DNA přírodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu, přičemž tato první složka řetězce je schopna regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA > ; ř_ öo v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž tato regulace je závislá na chemickém regulátoru, dále řetězec obsahuje druhou složku řetězce DNA, kterou je nebo s níž má podstatnou homologii část, avšak nikoliv celý řetězec transkribovatelného řetězce DNA, s níž je první složka sdružena v přírodně se vyskytujícím, chemicky regulovatelném genu. Přírodně se vyskytující chemicky regulovatelný gen může být rostlinného původu, tak jak se vyskytuje například v jednoděložných nebo ve dvouděložných rostlinách a může být řízen chemickým regulátorem pro indukci nebo pro represi. Druhou složkou řetězce DNA je typický kódový sled. Výhodnou druhou složkou řetězce DNA podle vynálezu je řetězec, který je kódem pro signální postup jakékoliv bílkoviny, k jejíž produkci dochází při expresi přírodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu.

Vynález zvláště zahrnuje řetězec DNA, které sestávají z prvního nekódového chemicky regulovatelného řetězce DNA a z druhého kódového řetězce

z genu pro bílkovinu PR, například z genu pro bílkovinu PR dvouděložné rostliny, s výhodou tabáku nebo okurky, jako je PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-1', PR-Q nebo PR-R, gen pro chitinázu nebo gen pro zásaditou nebo kyselou β -1,3-glukanázu. Výhodný je řetězec DNA z genu pro bílkovinu PR, v němž je transkripce řízena chemickým regulátorem pro indukci. Vynález zvláště zahrnuje řetězec DNA, v němž první nekódová složka je uložena v oblasti k zakončení 5' některého ze svrchu uvedených genů pro bílkovinu PR, například v oblasti přibližně 2000 párů bazí od počátků transkripce genu pro bílkovinu PR. Nejvýhodnější je řetězec DNA, který obsahuje výhodný svrchu uvedený nekódový řetězec a druhý kódový řetězec DNA, který je kódem pro signální peptid ve svrchu uvedeném smyslu.

Nejvýhodnější jsou v podstatě čisté řetězce DNA, tak jak byly uvedeny svrchu jako řetězec 1, řetězec 2, řetězec 5 a řetězec 6 a v podstatě čisté řetězce DNA s podstatnou homologií s uvedenými řetězci. Tyto řetězce jsou příkladem chemicky regulovatelných řetězců DNA, které obsahují první nekódový a druhý kódový řetězec DNA a jsou odvozeny od genů pro bílkoviny PR tabáku, PR-1a, a PR-1' a od dvou forem pro zásaditou β -1,3-glukanázu tabáku. Řetězec 1 je odvozen z genu PR-1a tabáku. Nukleotidy 1 až 1150 jsou nekódovým

řetězcem v oblasti 5' chemicky indukovatelného řetězce DNA, dále obsahuje tento řetězec část kódového sledu PR-la, který se přirozeně vyskytuje v tabákových rostlinách. V tomto případě se nachází chemicky indukovatelná složka řetězce v těsné blízkosti kódového sledu. Ty nukleotidy, které jsou kódem pro prvních třicet aminokyselin představují kódový řetězec pro signální peptid bílkoviny PR-la. Kódový sled je možno od nekódového sledu oddělit, čímž se získá nekódový, chemicky indukovatelný řetězec DNA, prostý jakéhokoliv kódového sledu, tak jak byl popsán svrchu v odstavci A. Toto oddělení je možno provést běžným způsobem, například rozštěpením působením restriktčního enzymu.

Vynález dále zahrnuje způsob výroby řetězce DNA, který obsahuje první složku řetězce, kterou je nebo která má podstatnou homologii s nekódovým, chemicky regulovatelným řetězcem DNA přirodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu, přičemž tato první složka řetězce je schopna řídit transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni a tato regulace současně závisí na chemickém regulátoru, druhou složkou řetězce DNA je řetězec, který je nebo který má podstatnou homologii s částí, avšak nikoliv s celým transkribovatelným řetězcem DNA, s nímž je první složka

sdužena v přírodně se vyskytujícím chemicky regulovatelném genu, přičemž DNA se izoluje z přírodně se vyskytujícího genu ve v podstatě čisté formě nebo se syntetizuje chemicky nebo enzymaticky. Výhodné jsou zvláště postupy, uvedené svrchu v odstavci A a v podstatě čisté řetězce DNA, které jsou získány uvedeným způsobem.

C. Chimérní geny, které obsahují chemicky regulovatelné řetězce DNA

Vynález se dále týká chimérních řetězců DNA (chimérních genů), které obsahují alespoň jeden chemicky regulovatelný řetězec DNA. Jako příklad je možno uvést dva typy takových chimérních řetězců. První z nich, dvoudílný chimérní řetězec DNA sestává z chemicky regulovatelného řetězce DNA a z transkribovatelného řetězce DNA, takže chimérní gen je schopen exprese v rostlinné tkáni za příslušných podmínek chemické regulace. Vynález se zejména týká chemicky regulovatelných chimérních řetězců DNA, které sestávají z první nekódové, chemicky regulovatelné složky řetězce, která je schopna regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž tato regulace je závislá na regulátoru, a z druhého řetězce DNA,

který může být transkribován v rostlině nebo v rostlinné tkáni. Jednotlivé složky řetězce DNA mohou být odvozeny od přírodních zdrojů nebo je možno je připravit synteticky.

Druhý řetězec DNA může být transkribován jako RNA, která je schopna řídit expresi fenotypického jevu tak zvaným protismyslným mechanismem. Druhý řetězec DNA v chiméřním řetězci DNA může tedy být podroben transkripci a translaci, to znamená, že může být v rostlinné tkáni kódem pro produkci polypeptidu, který je příčinou fenotypického jevu. Chiméřní gen se konstruuje takovým způsobem, že se druhý řetězec DNA správně spojí s chemicky regulovatelným řetězcem DNA, tak, aby byla zajištěna transkripce. Toto spojení je možno uskutečnit běžným způsobem, obvykle se řetězce spojí přímo spolu navzájem.

Výhodný je chiméřní řetězec DNA, který obsahuje jako první složku nekódový, chemicky regulovatelný řetězec DNA a jako druhou transkribovatelnou složku DNA, přičemž první, nekódový řetězec DNA je výhodným řetězcem, uvedeným svrchu v odstavci A. Tato první složka řetězce DNA může být regulována chemickým regulátorem pro indukci nebo pro represi. Specifickým řetězcem podle vynálezu je chiméřní řetězec DNA, v němž první složka řetězce DNA má podstatnou homologii s che-

micky regulovatelným řetězcem DNA v přírodně se vyskytující chemicky regulovatelném genu z rostliny.

Výhodný je chimérní řetězec DNA, němž je první složkou řetězce nebo v němž první složka má podstatnou homologii s chemicky regulovatelným řetězcem DNA v přírodně se vyskytující chemicky regulovatelném genu z rostliny a druhou složkou řetězce DNA je kódový řetězec, který je schopen transkripce a translace za vzniku polypeptidu, v jehož důsledku dochází k fenotypickému jevu. S výhodou je tento druhý řetězec DNA navázán bezprostředně na první složku řetězce DNA. Zvláště výhodný je takový chimérní řetězec DNA, v němž první složkou řetězce DNA je, nebo v němž první složka řetězce DNA má podstatnou homologii s chemicky indukovatelným řetězcem DNA v genu pro bílkovinu PR, například pro bílkovinu PR z dvouděložné rostliny, jako tabáku nebo okurky. Příklady byly uvedeny svrchu v odstavci A.

Druhý typ chimérního řetězce DNA obsahuje tři složky, které pocházejí ze dvou nebo většího počtu zdrojů. V nejjednodušším provedení sestává tento chimérní řetězec DNA ze dvoudílného řetězce DNA, tak jak je uveden svrchu v části B a ze třetího řetězce DNA, který pochází z alespoň jednoho zdroje. Tento typ DNA v podobě chimérního řetězce tedy zvláště obsahuje první složku, kterou je řetězec DNA, který je nebo který má podstatnou homologii

s nekódovým, chemicky regulovatelným řetězcem DNA přírodně se vyskytujícího, chemicky regulovatelného genu, přičemž tato první složka řetězce DNA je schopna řídit transkripci sdruženého sledu DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž současně je tato regulace závislá na chemickém regulátoru, druhou složkou řetězce DNA je, nebo tato složka má podstatnou homologii s částí, avšak nikoliv s celou délkou řetězce transkribovatelné DNA, s níž je první složka sdružena v přírodně se vyskytujícím chemicky regulovatelném genu, třetí složkou řetězce DNA je řetězec, který je schopen transkripce v rostlině nebo v rostlinné tkáni. Přírodně se vyskytujícím chemicky regulovatelným genem je s výhodou rostlinný gen.

Druhou a třetí složkou řetězce DNA tedy bude typicky kódový řetězec. Třetí složka DNA může být odvozena od více než jednoho přírodního nebo synthetického zdroje. Obě první složky řetězce DNA však budou s výhodou přírodního původu. V případě, že zdrojem je rostlina, může jít o rostlinu jednoděložnou, dvouděložnou nebo gymnospermní. Ve výhodném provedení bude druhá složka^a řetězce DNA zahrnovat sled nukleotidů, který je kódem pro signální peptid chemicky regulovatelného genu, v němž se vyskytují první dvě složky řetězce DNA. V případě že chemicky regulovatelný sled DNA je sdružen s částí kódového sledu z genu, z něž byl odvozen, musí být třetí složka DNA nejen

ve správné orientaci, avšak musí být také správně uložen vzhledem ke druhé složce řetězce DNA. Tuto správnou orientaci je možno zajistit běžným způsobem.

Výhodné jsou takové chimérní řetězce DNA, v nichž první a druhá složka je zvolena z řetězců, které byly uvedeny svrchu v odstavci B. Na příklad výhodným chimérním řetězcem je takový řetězec, v němž první složkou řetězce je, nebo první složka má podstatnou homologii s chemicky indukovatelným řetězcem DNA v genu pro bílkovinu PR z dvouděložné rostliny, například z tabáku nebo z okurky. Příklady genů pro bílkoviny PR byly uvedeny svrchu.

Chimérní geny, které byly svrchu popsány zahrnují celou řadu možných konstrukcí. Chemicky regulovatelný nekódový řetězec je možno spojit s genem, který řídí dozrávání nebo kvetení, s genem, který je příčinou tolerance nebo odolnosti proti herbicidům nebo k celé řadě škůdců, například houbám, virům, bakteriím, hmyzu, nematodům, nebo pavoukovitým, s genem, řídícím produkci enzymů nebo sekundárních metabolitů, s genem pro samčí nebo samičí sterilitu, pro zakrslost, vůni, živné hodnoty a podobně. Při použití vynálezu je možno tyto jevy zvýraznit, takže pěstitel již nebude závislý pouze na přírodních faktorech. Fenotypickým jevem zvláštního zájmu je produkce metabolitů ve tkáňové kultuře nebo v biologickém reaktoru.

Výhodným chimérním řetězcem DNA je řetězec, který obsahuje dvě nebo tři složky, přičemž kódová složka je kódem pro fenotypický jev, například ze skupiny tolerance nebo resistance proti herbicidům, houbám, virům, bakteriím, hmyzu, nematodům nebo pavoukovitým, dále, pro produkce sekundárních metabolitů, samčí nebo samičí sterilita, a produkce enzymů nebo jiných látek. Zvláště výhodný je chimérní řetězec DNA ze dvou nebo tří složek, v němž kódová složka je kódem pro toleranci nebo resistenci proti herbicidům, například pro syntetázu aceto-hydroxykyseliny (AHAS) nebo v nichž kódová složka je kódem pro odolnost proti hmyzu, například kódem pro odolnost proti endotoxinu *Bacillus thuringiensis* (BT).

V případě, že chimérní řetězec má být užit jako zkouška na produkci chemických regulátorů, je fenotypickým jevem s výhodou zjistitelná látka. Vhodným značením tohoto typu je, avšak bez nároku na úplnost výčtu luciferáza (LUX), chloramfenikolacetyltransferáza (CAT), neomycinofosfotransferáza (NPT), nopalinsyntetáza (NOS), octopinsyntetáza (OCS), beta-1,3-glukuronidáza (GUS), aceto-hydroxykyselina syntetáza (AHAS), a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT). Výhodnými značícími látkami jsou beta-1,3-glukuronidáza (GUS), syntetáza aceto-hydroxykyseliny (AHAS) a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

Representativním příkladem takového chimérického řetězce DNA, který bude podrobně popsán v příkladové části, je dvoudílný chimérický sled DNA, který obsahuje nekódový řetězec genu PR-1a z jeho 5'-části. Jedním ze svrchu uvedených označení je kódový sled pro gen GUS, je však možno užít jakéhokoli označení. Analogický trojdílný chimérický řetězec obsahuje část kódového sledu genu PR-1a. Tyto konstrukce jsou zvláště použitelné, protože účinek chemické indukce, tj. účinnost enzymu beta-glukuronidázy, je možno v rostlinných buňkách nebo v extraktech těchto buněk snadno pozorovat. Další zvláštní provedení, například ta, která obsahují nekódový sled některého z genů pro beta-1,3-glukanázu tabáku nebo kódový řetězec pro syntézu kyseliny acetoxykyseliny nebo pro endotoxin *Bacillus thuringiensis* jsou popsána v části L, tj. v příkladové části.

Výhodným chimérickým řetězcem DNA je dvousložkový nebo tříložkový řetězec, v němž první složkou je oblast genu PR-1a tabáku, a to jeho 5'-část, která obsahuje více než 300, například 300 až 2 000, s výhodou 600 až 1 000 párů bazí od počátku transkripce.

Dále je výhodný chimérický řetězec DNA, který obsahuje tři složky, přičemž druhá ze složek řetězce je kódem pro signální peptid, například pro peptid, který je nebo má podstatnou homologii se signálním peptidem, pro nějž je kódem gen PR, například gen PR-1a.

Vynález dále zahrnuje způsob výroby chemicky regulovatelného chimérodního řetězce DNA, který obsahuje první nekódovou, chemicky regulovatelnou oblast, schopnou řídit transkripci sdruženého sledu DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž tato regulace je závislá na chemickém regulátoru, a druhý řetězec, který je schopen transkripce do rostliny nebo rostlinné tkáně, přičemž obě složky jsou na sebe navázány. Vynález zahrnuje způsob výroby chimérodního řetězce DNA, obsahujícího první složku řetězce která je nebo která má podstatnou homologii s nekódovým, chemicky regulovatelným řetězcem DNA z přírodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu, přičemž tato první složka je schopna regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni a tato regulace je závislá na chemickém regulátoru, druhá složka řetězce je nebo má podstatnou homologii s částí, avšak nikoliv s celým řetězcem transkribovatelné DNA, která je s první složkou řetězce sdružena v přírodně se vyskytujícím chemicky regulovatelném genu a třetí složka řetězce je schopna transkripce v rostlině nebo v rostlinné tkáni, postup se provádí tak, že se jednotlivé složky řetězce DNA současně nebo po sobě na sebe naváží.

D Vektory

Vektory, produkované standardním způsobem a obsahující buď regulovatelné řetězce DNA, popsané v odstavcích A nebo B nebo chimérní řetězce DNA, popsané v odstavci C tvoří další oblast vynálezu. Vektory jsou rekombinantní řetězce DNA, které je možno použít pro izolaci a multiplikaci svrchu uvedených řetězců DNA a pro transformaci vhodných hostitelů pomocí uvedených řetězců. Výhodnými vektory pro izolaci a multiplikaci jsou plasmidy, které mohou být propagovány ve vhodném hostitelském mikroorganismu, například v *E. coli*. Výhodnými vektory pro transformaci jsou ty vektory, které jsou použitelné pro transformaci rostlinných buněk nebo *Agrobacterium*. Zvláště v případě, že rostlinné buňky odlišné od protoplastů je zapotřebí podrobit transformaci, je výhodným vektorem Ti-plasmid nebo vektor, odvozený od tohoto plasmidu. Pro přímý přenos DNA do protoplastů je možno použít jakýkoliv ze svrchu uvedených vektorů. Příslušné vektory, které je možno využít jako výchozí materiály jsou v oboru známy. Vhodné vektory pro transformaci rostlinných tkání a protoplastů byly popsány v publikacích deFramond A. a další, *Bio/Technology* 1, 263 (1983), An G. a další, *EMBO J.* 4, 277 (1985), Potrykus I. a další svrchu, Rothstein S.J. a další, *Gene* 53, 153 (1987) Kromě vektorů, které jsou uvedeny v těchto

publikacích byla v oboru popsána ještě řada dalších vektorů, které jsou vhodné jako výchozí materiály při uvádění vynálezu do skutečnosti.

Vektory, které obsahují pouze chemicky regulovatelné řetězce DNA jsou popsány svrchu v části A nebo B a je možno je použít jako meziprodukty pro přípravu vektorů, které obsahují chiméřní řetězce DNA, tak jak byly popsány svrchu v odstavci C. Při včlenění příslušného řetězce, který je schopen transkripce do takového vektoru, který je meziproduktem dochází ke vzniku vektoru, který obsahuje chiméřní řetězec DNA a který může být použit pro transformaci požadované rostlinné tkáně, protoplastu nebo jiné hostitelské buňky. Je také možno postupovat tak, že se nejprve připraví chiméřní řetězec, který se pak včlení do vhodného vektoru a vektor se použije pro transformaci požadované rostlinné tkáně nebo jiného hostitele.

Konstrukci a multiplikaci vektorů je možno uskutečnit ve vhodném hostiteli, například v *E. coli*. Vhodnými kmeny *E. coli* jsou například *E. coli* HB101, JMS3, DH1, DH5 α , LE392 a podobně. Vektory podle vynálezu je možno použít jako takové pro přímý přenos genu nebo pro mikroinjekční metodu. V některých případech může být výhodné linearizovat vektor před jeho použitím. Je také možno postupovat tak, že se vektory přenesou jako do hostitele do *Agrobacterium*. Tanto přenos je možno uskutečnit^t běžným způsobem.

sobem, například kopulací dvou rodičovských buněk podle publikace Simon R. a další, Bio/Technology 1, 74 (1983), tří rodičovských buněk podle publikace Ditta G. a další, Proc. Natl. Acad. Sci USA 77, 7347 (1980) nebo transformací podle publikace Holsters M. a další, Mol. Gen. Genet. 163, 181 (1987). Vhodnými kmeny Agrobacterium jsou například A. tumefaciens LBA4404; CIB542 a C58Z707, vynález však nemá být na tyto kmeny omezen.

Výhodnými vektory jsou ty, které obsahují výhodné řetězce DNA, tak jak byly uvedeny svrchu v odstavcích A, B a C. Mimoto je výhodným vektorem takový vektor, který je funkční v rostlinné buňce nebo v Agrobacteriu. Zvláště výhodnými jsou takové vektory, které budou dále popsány v části L, tj. v příkladové části.

E. Rostlinné tkáně, rostliny a semena

Vynález se dále týká rostlinných tkání, rostlin a semen, které obsahují chimérní řetězce DNA, popsané svrchu. Výhodné jsou rostlinné tkáně, rostliny nebo semena, která obsahují ty chimérní řetězce DNA, které byly svrchu obecně popsány.

Buňky rostlinných tkání je možno transformovat při použití svrchu uvedených vektorů jakýmkoliv známým způsobem včetně způsobů, které jsou popsány ve svrchu

uvedených publikacích a jakýmkoliv způsobem, který bude dále uveden v příkladové části přihlášky. Jde například o přímou infekci nebo společnou kultivaci rostlin nebo rostlinných tkání s *Agrobacteriem*. V^lelmi vhodnou technikou je použití transformace kotoučků, v⁴říznutých z listů, které bylo popsáno v publikaci Horsch R.B. a další, *Science* 225, 1229 (1985). Je také možno postupovat tak, že se vektor přenese přímo, například otevřením pórů pomocí elektrického proudu, mikroinjekční technikou nebo transformací protoplastů za přítomnosti polyethylenglykolu (PEG), chloridu vápenatého nebo v elektrickém poli, jak bude dále podrobněji popsáno.

Transformované buňky mohou pocházet ze dvouděložných nebo z jednoděložných rostlin a mohou obsahovat jeden nebo větší počet chemicky regulovatelných genů, zejména chimérních genů podle vynálezu. Manipulacemi s použitím chemických regulátorů je například možno geny, které jsou kódem pro například toleranci nebo resistenci proti herbicidům nebo různým hmyzům, virům, bakteriím, houbám a jiným škůdcům, pro sterilitu, rozměr rostlin, kvetení nebo zrání plodů včlenit do rostlinné tkáně a získané buňky nebo protoplasty je pak možno regenerovat na rostliny, v nichž jsou uvedené fenotypické jevy regulovány. Je také možno postupovat tak, že se buňky pěstují v tkáňové kultuře nebo

v biologickém reaktoru k výrobě enzymů nebo sekundárních metabolitů. V případě, že je zapotřebí provádět enzymatické zkoušky, může kódový řetězec chimérického genu například obsahovat gen pro LUX, CAT, NPT, NOS, OCS, GUS, AHAS nebo BT, jak byly shora uvedeny. Takové chimérické geny obsahují chemicky indukovatelný řetězec z genu PR a představují výhodné provedení vynálezu pro snadnost použití regulátoru a také pro snadnost detekce produktu, kterým je enzym.

Po transformaci se transformovaná buňka nebo rostlinná tkáň podrobí selekci běžným způsobem. Transformovaná buňka nebo buněčná tkáň obsahuje chimérický řetězec DNA, tak jak byly svrchu uvedeny a je možno ji regenerovat v případě potřeby známým způsobem včetně těch, které byly uvedeny ve svrchu uvedených publikacích a které budou dále uvedeny v příkladové části pro jednoděložné i dvouděložné rostliny. V čeledi, které je možno tímto způsobem regenerovat zahrnují, avšak nejsou omezeny na kukuřici, slunečnici, řepku, jetel, tabák, bavlník, vojtěšku, rýži, brambor a okurky. Regenerované rostliny se sledují na transformaci standardními postupy. Stejným způsobem se sleduje potomstvo regenerovaných rostlin a kontinuálně se podrobuje selekci na přítomnost integrovaného řetězce DNA, tak, aby bylo možno vyvinout zlepšené rostlinné linie a jejich semena. Řetězec DNA

je možno převést do jiné genetické linie celou řadou způsobů včetně klasického šlechtění, fúzí protoplastů, přenosem jádra a přenosem chromosomu.

F. Výhody a použití

Vynález poskytuje celou řadu výhod, zejména umožňuje snadno regulovat expresi chimérních genů, které obsahují chemicky regulovatelné řetězce DNA v rostlinách nebo v rostlinných tkáních. Regulace genů, působící protismyslným mechanismem nebo genů, jejichž exprese má za následek vznik fenotypického jevu je tímto způsobem rovněž možná. Zvláštní význam má možnost řídit dobu a míru exprese genů a snadnost uskutečnění tohoto řízení, a to rovnoměrně v celé rostlině nebo místně v některých částech rostliny.

Řízení je možno uskutečnit jednoduchým způsobem tak, že se uvede chemický regulátor do styku s rostlinnou tkání, s rostlinou nebo s částí této rostliny takovým způsobem a v takovém množství, že dojde k regulaci chimérního genu, jehož exprese v rostlinných buňkách, v rostlinné tkáni nebo v rostlinách je požadována. Například v případě, že exprese je příčinou fenotypického jevu, k němuž dochází především v listech,

je možno postřikem nebo poprašováním těchto listů v době, v níž je možno dosáhnout optimální exprese v listech zajistit vyvolání fenotypického jevu předtím, než dojde k migraci do jiných částí rostliny.

Je také možno dosáhnout rovnoměrné exprese v nadzemní části rostliny aplikací na celou rostlinu, to znamená na stonek a na obě strany listů. V případě, že je požadována exprese v kořenech, může být nutné nanést regulátor na semena nebo do půdy kolem semen nebo kolem kořenů. Exprese v biologickém reaktoru je možno dosáhnout zcela snadno například tak, že se chemický regulátor přidá do živného prostředí, s nímž se pěstované buňky dostávají do styku.

Možnost řídit čas, míru a/nebo expresi genů za vzniku fenotypických jevů v transgenických rostlinách poskytuje celou řadu využitelných výhod. Například v případě, že se zavede do rostliny detoxifikační mechanismus proti herbicidu nebo jinému pesticidu, je možno vhodný účinek znásobit jeho příslušným načasováním tak, že se chemický regulátor nanese ve vhodnou dobu. Regulátor je například možno použít před nebo po aplikaci herbicidu nebo jiného pesticidu v závislosti na tom, při kterém z těchto způsobů je možno dosáhnout optimální tolerance.

Nyní je také možné řídit produkci sloučenin, jejichž biosyntéza je řízena endogenními nebo cizorodými geny. Po chemické indukci produkce takových produktů může být uskutečněna v požadované době. Indukovaným postupem může být vícestupňová biosyntéza nebo jednostupňová přeměna určitého metabolitu.

Další výhoda vynálezu se zakládá na schopnosti řídit vývojové pochody v rostlinách v požadované době použitím chemického regulátoru. Tímto způsobem je například možno synchronizovat vývoj rostliny, tj. klíčení, tvorbu výhonků, tvorbu květního stonku a květů, dozrávání plodů, schnutí, opadání listů a podobně. Mimoto je také možno zbrzdit nebo zastavit normální vývoj rostliny. Toho je možno dosáhnout například členěním toxického genu, který interferuje s požadovaným stupněm vývoje, řetězce DNA, který bude blokovat vývojový stupeň protismyslným mechanismem nebo genu, při jehož expresi dochází k blokování přechodu na další vývojový stupeň, který může být chemicky potlačen, takže po potlačení genu může vývoj pokračovat. Dalším vhodným použitím je indukce samičí nebo samčí sterility při řízené hybridizaci některých plodů.

Další výhoda vynálezu spočívá v poskytnutí nových postupů pro stanovení určitých látek,

s výhodou enzymů. Například je tímto způsobem možno snadno identifikovat nové chemické regulátory. Tyto postupy zahrnují také použití transformovaných rostlin nebo rostlinných buněk, které obsahují chimérní řetězec DNA podle vynálezu. Chemická látka se uvede do styku s transformovaným hostitelem a pak se měří transkripce transkribovatelného řetězce DNA proti kontrole. Tuto transkripci je obvykle možno prokázat ve formě produktu translace nebo účinkem takového produktu. Tyto postupy je možno provádět celou řadou způsobů, typické je však jejich provedení při použití celých, regenerovaných rostlin, na něž se působí chemickým regulátorem, nebo na buňky nebo tkáňové kultury, přičemž se chemická látka uvádí do styku s buňkami nebo s tkání, načež se přidá substrát pro příslušný enzym, jehož účinnost má být prokázána. Tímto způsobem je pak možno prokázat enzymatickou účinnost standardními postupy, například spektrofotometricky.

Vynález zvláště zahrnuje způsob identifikace chemického regulátoru, který spočívá v tom, že se hostitel transformuje chimérním řetězcem DNA, popsáním svrchu v odstavci C nebo vektorem, který obsahuje uvedený chimérní řetězec DNA, načež se transformovaný hostitel uvede do styku s příslušným chemickým regulátorem a měří se exprese fenotypického jevu. Výhodným postupem je takový postup, při němž se jako transformovaného

hostitele užívá rostlinné tkáně nebo rostlinných buněk. Dále je výhodný také postup, při němž je chiméřním řetězcem DNA řetězec, který byl svrchu uveden jako výhodný, jde například o případ, v němž první složka sledu chiméřní DNA je chemicky indukovatelný řetězec, který je nebo který má podstatnou homologii s chemicky indukovatelným řetězcem genu pro bílkovinu PR, přičemž fenotypickým jevem, pro nějž je kódem tento chiméřní řetězec DNA je stanovitelný enzym.

Vynález se dále týká nových metod, kterými je možno identifikovat další chemicky regulovatelné řetězce DNA. Připraví se vektor, který obsahuje chemicky regulovatelný řetězec DNA, například z hostitele, kterého je možno podrobit selekci a také látku, kterou je možno užít k označení. Vhodnými značícími prvky jsou například geny pro odolnost proti antibiotikům a geny pro odolnost proti herbicidům. Reprezentativní geny pro odolnost proti antibiotikům jsou například gen pro odolnost proti hygromycinu, kanamycinu, chloramfenikolu, bleomycinu, puromycinu, linkomycinu, G418 a methotrexátu. Zvláště vhodným genem pro odolnost proti hygromycinu je gen pro aminoglykosidfosfotransferázu IV. Vhodné vektory pro transformaci rostlin, které obsahují gen pro odolnost proti hygromycinu byly popsány v publikaci Rothstein S. J., a další, Gene 53, 153 (1987). Příkladem genů pro odolnost

proti herbicidům mohou být geny, které zajišťují odolnost například proti derivátům sulfonylmočoviny, glyfosátu, fosfinotricinu a atrazinu.

Vhodnými značícími látkami jsou také geny pro enzymy, antigeny, imunoglobuliny a podobně, stejně jako geny pro odolnost proti antibiotikům. Vhodnými značícími složkami jsou geny pro LUX, CAT, NPT, NOS, OCS, GUS, AHAS a BT. Zvláště vhodným enzymem je β -1,3-glukuronidáza (GUS), protože její stanovení je velmi snadné. Řetězec DNA, který je kódem pro zjistitelnou značící složku, je možno včlenit do uvedeného vektoru běžnými způsoby.

Regulovatelný řetězec DNA se typickým způsobem včleňuje bezprostředně ke genu pro zjistitelnou značící vlastnost, takže exprese genu, který zajišťuje značící vlastnost je pod řízením řetězce DNA, jehož exprese má být prokázána. Vektor se pak užije k transformaci rostlinné tkáně nebo jiného vhodného hostitele. Transformovaná rostlinná část nebo hostitel se podrobí selekci podle značící vlastnosti, například podle odolnosti proti antibiotiku. Pak se uvede rostlinná tkáň nebo jiný hostitel do styku s chemickým regulátorem, načež se provádí selekce, nebo se selekce provádí až po regeneraci transformované tkáně. Při indukci nebo represii značící vlastnosti po aplikaci chemického regulátoru

je možno identifikovat požadovaný řetězec DNA jako řetězec, který je schopen regulace transkripce sdruženého řetězce DNA, přičemž toto řízení je závislé na chemickém regulátoru. Tyto zkoušky je možno provádět na celé, regenerované nebo transformované rostlině, například tak, že se chemický regulátor nanese na listy nebo na jinou tkáň rostliny a měří se exprese značícího jevu. Zkoušku je možno provádět také na transformované tkáni kalu nebo jiného hostitele v buněčné kultuře tak, že se chemický regulátor nanese na kalus nebo na jinou tkáň v kultuře a pak se měří exprese značícího jevu.

Vynález zvláště zahrnuje způsob pro identifikaci chemicky regulovatelného řetězce DNA, který spočívá v tom, že se

- a) hostitel transformuje chemicky regulovatelným řetězcem DNA nebo vektorem, který obsahuje takový řetězec a mimoto druhý řetězec DNA, který je kódem pro značící jev, volitelný podle hostitele a třetí řetězec DNA, který je kódem pro fenotypický jev,
- b) na takto transformovaného hostitele se nanese chemický regulátor a
- c) měří se exprese nebo se provádí selekce na základě změny exprese fenotypického jevu, pro nějž je kódem třetí řetězec DNA.

Výhodné jsou takové postupy, v nichž se volí třetí řetězec DNA podle hostitele a postupy, v nichž druhý a třetí řetězec DNA jsou geny pro odolnost proti herbicidům nebo pro odolnost proti antibiotikům a volí se například ze skupiny genů pro odolnost proti hygromycinu, kanamycinu, chloramfenikolu, bleomycinu, puromycinu, linkomycinu a methotrexátu, jde například o gen pro odolnost proti hygromycinu, který je genem pro aminoglykosidfosfotransferázu IV.

Výhodné jsou také takové postupy, v nichž je chemicky regulovatelný řetězec DNA spojen s třetím řetězcem DNA, s výhodou se nachází v jeho těsné blízkosti. Dále jsou výhodné také ty postupy, v nichž je transformovaným hostitelem rostlinná tkáň nebo rostlinné buňky.

Dále jsou výhodné takové postupy, v nichž je třetí řetězec DNA kódem pro stanovitelné enzymy, například ze skupiny, zahrnující luciferázu (LUX), chloramfenikolacetyltransferázu (CAT), neomycinfosfotransferázu (NPT), nopalinsyntetázu (NOS), oktopinsyntetázu (OCS), β -1,3-glukuronidázu (GUS), syntetázu aceto-hydroxykyseliny (AHAS) a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

Vynález se dále týká v podstatě čistých, chemicky regulovatelných řetězců DNA, které lze identifikovat svrchu uvedenými postupy.

Vynález se rovněž týká způsobu selekce transformovaného rostlinného materiálu. Rostlinný materiál, obsahující exogenní řetězec DNA s chemicky regulovatelným sledem DNA, pro něž je chemický regulátor znám a druhý řetězec DNA pro fenotypický jev se zpracuje působením chemického regulátoru, načež se sleduje, zda došlo k expresi fenotypického jevu. V případě, že jev je možno pozorovat, znamená to potvrzení transformace rostlinného materiálu uvedeným řetězcem. Typickým fenotypickým jevem pro toto použití jsou jevy, které byly svrchu uvedeny jako značící jevy.

Vynález se zvláště týká způsobu selekce transformovaných rostlinných buněk nebo tkání, které byly podrobeny transformaci pomocí DNA, sestávající z první složky řetězce, která je chemicky regulovatelná známým chemickým regulátorem, ze druhého řetězce, který je kódem pro fenotypický značící jev, a to tak, že se

- a) transformanty, padající v úvahu zpracují působením chemického regulátoru, načež se
- b) transform^anty podrobí selekci na základě fenotypického jevu, pro nějž je kódem svrchu uvedený druhý řetězec DNA.

Výhodným postupem pro toto použití je postup, při němž je fenotypickým jevem odolnost proti antibiotiku, například odolnost proti hygromycinu, kanamycinu, chloramfenikolu, bleomycinu, puromycinu, linkomycinu, G418 a methotrexátu, nebo může jít o značící enzym, který je možno volit například ze skupiny luciferáza (LUX), chloramfenikolacetyltransferáza (CAT), neomycinofosfotransferáza (NPT), nopalinsyntetáza (NOS), okropinsyntetáza (OCS), β -1,3-glukuronidáza (GUS), syntetáza acetoxykyseliny (AHAS) a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

G. Signální peptidy

Signální peptidy nebo signální řetězce jsou zvláštní N-terminální řetězce aminokyselin v bílkovině, která vstupuje do endoplasmatického retikula. Takový řetězec obsahuje v eukaryotické buňce obvykle 15 až 40 zbytků aminokyselin, z nichž řada je hydrofobní. Tento řetězec je možno popřípadě od výsledné bílkoviny odštěpit.

V souvislosti s vynálezem je možno signální peptid chemicky regulovatelného genu využít při konstrukci třídílných chimérních řetězců, které byly

svrchu popsány. Tyto chimérní konstrukce obsahují první chemicky regulovatelný řetězec, druhý řetězec DNA, který je kódem pro signální peptid v bílkovinách a třetí řetězec, který je kódem pro fenotypický jev. Tímto fenotypickým jevem je s výhodou jev, který je možno snadno prokázat. Včlenění řetězce, který je kódem pro signální peptid do konstrukce chimérní DNA dovoluje směřovat produkt, k jehož expresi dochází přítomností třetího řetězce DNA ven z endoplasmatického retikula hostitelské buňky směrem k jeho konečnému cílovému místu.

Vynález se proto dále týká signálního peptidu z bílkoviny, pro niž je kódem gen PR-la tab⁹lky a také bílkoviny s řetězcem aminokyselin s podstatnou homologií s tímto peptidem. Uvedený peptid je možno charakterizovat následujícím řetězcem zbytků aminokyselin:

MetGlyPheValLeuPheSerGlnLeuProSerPheLeuLeuVal-

SerThrLeuLeuLeuPheLeuValIleSerHisSerCysArgAla.

Vynález také zahrnuje řetězec DNA, který je kódem pro uvedený peptid (jde o svrchu uvedený řetězec 1) a řetězce DNA s podstatnou homologií s tímto řetězcem. Jak již bylo svrchu uvedeno, vynález se týká také

- 1) řetězců DNA, které obsahují chemicky regulovatelné řetězce v kombinaci s kódovými řetězci pro různé signální peptidy a
- 2) trojdílné řetězce chimérické DNA, které obsahují chemicky regulovatelnou složku, kódový řetězec pro signální peptid a řetězec DNA, k jehož transkripci dochází s výhodou za translace.

H. Nové geny PR

Vynález se také týká nově izolovaných DNA genomu PR a řetězců cDNA z genů tabáku, označovaných PR-1a, PR-1' a PR-R, patogenem indukovatelné chitinázy z okurky, PR-Q z tabáku, zásadité β -1,3-glukanázy 39.1 a 39.3 z tabáku, kyselé β -1,3-glutanázy z tabáku a řetězců DNA, které jsou s těmito geny v podstatě homologní. Řetězce DNA těchto genů jsou uvedeny svrchu jako řetězce 1 až 8. Nové geny s řetězci 1, 2, 5 a 6 (PR-1a, PR-1', a β -1,3-glukanáza 39.1 a 39.3) představují také zvláštní provedení nekódových chemicky regulovatelných řetězců DNA podle vynálezu, tak jak byly svrchu uvedeny. Nové řetězce 3, 4, 7 a 8 jsou kódem pro bílkoviny PR chitinázy okurky, PR-R tabáku, PR-Q tabáku a kyselou formu β -1,3-glukanázy. Podrobnosti, týkající se

způsobu izolace a charakterizace uvedených genů budou dále uvedeny v příkladové části.

I. Chemické regulátory

Chemický regulátor je definován jako látka, řídící expresi genu přes chemicky regulovatelný řetězec DNA za určitých okolností. Tato látka, v iontové nebo neutrální formě, za přítomnosti nebo v nepřítomnosti solvatačních nebo jiných komplexotvorných molekul nebo aniontů je obvykle endogenního původu relativně k systému, který obsahuje chemicky regulovatelný gen v období, v němž má být dosaženo jeho regulace. Použití endogenních chemických regulátorů je výhodné z toho důvodu, že se snáze řídí a stanoví množství regulátoru v uvedeném systému. Vynález však zahrnuje také možnost použití endogenních regulátorů, například chemických látek, jejichž účinnost nebo jejichž množství v použitém systému je možno uměle řídit jinými složkami, které se nacházejí v uvedeném systému nebo které na uvedený systém působí.

Chemické regulátory zahrnují ty chemické látky, o nichž je známo, že indukují vznik bílkovin PR v rostlinách nebo blízké deriváty těchto

látek. Jde například o kyselinu benzoovou, kyselinu salicylovou, kyselinu polyakrylovou a substituované deriváty těchto látek, přičemž vhodnými substituenty jsou nižší alkyl, nižší alkoxykupina, nižší alkylthioskupina a atom halogenu. V případě, že se tento chemický regulátor nanese na rostlinnou tkáň, obvykle na listy nebo na celou rostlinu, dochází v rostlině ke zvýšení množství mRNA a bílkovin PR.

Další skupinu regulátorů pro chemicky regulovatelné řetězce DNA a chimérické geny podle vynálezu jsou látky, jejichž základní strukturou je benzo-1,2,3-thiadiazol, jde tedy například o následující typy sloučenin: kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylová, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolthiokarboxylová, kyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, amid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové, hydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové a deriváty těchto látek, vynález však nemá být na tyto látky omezen.

Výhodnou skupinou regulátorů jsou například následující látky: kyselina benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylová, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazol-7-thiokarboxylová, 7-kyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, amid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, hydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové a deriváty těchto látek.

Vhodné deriváty zahrnují, avšak nejsou omezeny na ty typy sloučenin, v nichž je benzo-1,2,3-thiadiazolová skupina nesubstituovaná nebo je substituována malými substituenty, jakých se obvykle užívá v systémech aromatických kruhů pro zemědělské použití, jde například o nižší alkyl, nižší alkoxykupinu, nižší halogenalkyl, nižší halogenalkoxykupinu, nižší alkylthioskupinu, kyanoskupinu, nitroskupinu a atom halogenu. Vhodné deriváty také zahrnují například ty benzo-1,2,3-thiadiazolové sloučeniny, v nichž buď funkční skupina karboxylové kyseliny, thiokarboxylové kyseliny, amidu karboxylové kyseliny nebo hydrazidu karboxylové kyseliny není substituována nebo je substituována alifatickými, arylalifatickými nebo aromatickými zbytky. Vhodné zbytky zahrnují například alkyl, zvláště nižší alkyl, alkoxykupinu, zvláště nižší alkoxykupinu, nižší alkoxyalkyl, alkoxyalkoxyalkyl, cykloalkyl, cykloalkylalkyl, fenylalkyl, zvláště benzyl, naftylalkyl, fenoxylalkyl, alkenyl nebo alkynyl, přičemž alkylová část těchto substituentů není substituována nebo je popřípadě dále substituována hydroxyskupinou, atomem halogenu, kyanoskupinou nebo nitroskupinou a aromatická část substituentů není substituována nebo je substituována malými substituenty, běžně užívanými v systémech aromatických kruhů pro zemědělské účely, jako jsou například

nižší alkyl, nižší alkoxykupinu, nižší halogenalkyl, nižší halogenalkoxykupina, nižší alkylthioskupina, kyanoskupina, nitroskupina a atom halogenu.

Regulátory, které jsou založeny na struktuře benzo-1,2,3-thiadiazolu zahrnují všechny molekulární systémy, které jsou schopné uvolnit molekulu, působící jako chemický regulátor.

Výhodnou skupinou regulátorů, založených na struktuře benzo-1,2,3-thiadiazolu jsou například kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylová a alkylbenzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylát, v němž alkylová skupina obsahuje jeden až šest atomů uhlíku a substituované deriváty těchto sloučenin. Vhodnými substituenty jsou nižší alkyl, nižší alkoxykupina, nižší alkylthioskupina a atom halogenu. Výhodnými induktory pro chimerní řetězce DNA, které obsahují chemicky regulovatelné sledy DNA, izolované z genů pro bílkoviny PR jsou zvláště kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylová a její alkylestery, například methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát. Syntéza svrchu uvedených chemických regulátorů a jejich použití jako biocidních látek bylo popsáno v britském patentovém spisu č. 1 176 799 a v publikaci Kirby P. a další, J. Chem. Soc. C 2250 (1970).

Deriváty benzo-1,2,3-thiadiazolu, které je možno dále užít jako chemické regulátory v souladu s vynálezem jsou popsány v US patentové přihlášce č. 234 241, která byla podána 18. srpna 1988.

Z výhodných chemických regulátorů, které jsou založeny na základní struktuře benzo-1,2,3-thiadiazolu je možno uvést například kyselinu benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylovou, methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxalát, n-propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát, benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát, sek-butylhydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové a podobně.

Další skupina chemických regulátorů pro chemicky regulovatelné řetězce DNA podle vynálezu je založena na struktuře kyseliny pyridinkarboxylové, jde například o kyselinu isonikotinovou a s výhodou o kyselinu halogenisonikotinovou. Výhodné jsou zejména kyseliny dichlorisonikotinové a jejich deriváty, například jejich nižší alkylestery. Vhodnými chemickými regulátory, spadajícími do této skupiny látek jsou například kyselina 2,6-dichlorisonikotinová a její nižší alkylestery, zvláště její methylester.

Vynález se dále týká způsobu regulace transkripce chemicky regulovatelného genu, tím způsobem, že se uvede do styku chemický regulátor a rostlinná tkáň, rostlina nebo semeno s obsahem chemicky regulovatelného řetězce DNA z odstavce A, B nebo C svrchu. Výhodné jsou ty postupy, v nichž rostlinná tkáň rostlina nebo semeno obsahují takové chemicky regulovatelné řetězce DNA, které byly uvedeny svrchu jako výhodné.

Chemické regulátory je možno nanášet v čisté formě, v roztoku nebo v suspenzi jako prášku, nebo poprášku nebo v jakémkoliv jiném obvyklém tvaru, užívaném v zemědělství nebo při postupech, prováděných v biologických reaktorech. Tyto prostředky mohou obsahovat pevné nebo kapalné nosiče, to znamená materiál, s nímž se chemický regulátor mísí k usnadnění jeho aplikace na rostlinu, rostlinnou tkáň, buňku, tkáňovou kulturu a pod. nebo pro usnadnění skladování, transportu a podobně. Příkladem vhodných nosičů pro toto použití jsou silikáty, hlínky, uhlík, síra, pryskyřice, alkoholy, ketony, aromatické uhlovodíky a podobně. V případě běžného zpracování na smáčivý prášek nebo vodnou emulzi může prostředek s obsahem regulátoru obsahovat jednu nebo větší počet běžných povrchově aktivních látek iontového nebo neiontového typu, jako smáčedla, emulgátory nebo dispergační činidla.

Regulátor je možno na rostliny nanášet také v kombinaci s dalšími činidly, které mohou přinést určitý požadovaný účinek, který se vztahuje nebo nevztahuje k jevu, řízenému chimérním genem, který je řízen chemickým regulátorem. Je například možno regulátor smísit s hnojivem a směs aplikovat těsně před expresí transgenického jevu, který je požadován nezávisle na hmožení. Je také možno smísit chemický regulátor například s herbicidem a směs nanést ke zmírnění účinku herbicidu v době, kdy by jinak nepříznivý účinek byl maximální.

Ve formě kapalného prostředku je možno regulátor nanášet na listy, stonek nebo větve rostlin ve formě postřiku, na semena před jejich uložením do půdy nebo jiného růstového prostředí. Uvedené chemické regulátory je možno použít také v biologických reaktorech, řízení je v tomto případě možno dosáhnout jednoduchým jednorázovým přidáním prostředku s obsahem chemického regulátoru do reakčního prostředí nebo jeho postupným přidáváním v průběhu předem stanoveného časového rozmezí.

Chemický regulátor se užije v takovém množství a po takovou dobu, aby bylo možno vyvolat požadovanou regulaci. Výhodný regulátor je takový, který nemá žádné nebo má pouze minimální fytotoxické účinky nebo jiné škodlivé účinky na celou rostlinu, na rostlinnou

tkáň nebo na rostlinné buňky, s nimiž je uváděn do styku a v množství, v němž se použije.

Výhodné řetězce DNA jsou ze svrchu uvedených řetězců v odstavcích A nebo B a výhodné chimérické řetězce DNA jsou z řetězců, uvedených v odstavci C, . zvláště ty řetězce, jejich transkripce je regulována chemickým regulátorem, uvedeným svrchu, zvláště takovým, který se volí ze skupiny, obsahující kyselinu benzoovou, kyselinu salicylovou, kyselinu acetylosalicylovou, kyselinu polyakrylovou a jejich substituční deriváty nebo ze skupiny, obsahující kyselinu benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylovou, kyselinu benzo-1,2,3-thiadiazolthiokarboxylovou, kyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, amid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové, hydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové a deriváty těchto látek nebo kyseliny dichlorisonikotinové nebo její deriváty. Nejvýhodnější jsou ty řetězce DNA, v nichž je transkripce řízena svrchu uvedenými výhodnými chemickými regulátory, jako je například kyselina benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylová, methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát, n-propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát, benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát, sek.butylhydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, kyselina 2,6-dichlorisonikotinová nebo methyl-2,6-dichlorisonikotinát, zvláště methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát.

J. Uložení ve sbírce ATCC

Ve veřejné sbírce kultur American Type Culture Collection byly uloženy následující bakterie, plasmidy a kultury v suspenzi:

E. coli HB101/pTJS75-Km, ATCC č. 67628, mikroorganismus byl uložen 12. února 1988.

Plasmid pBS-PR1013Cla, ATCC č. 40426, byl uložen 12. února 1988.

Plasmid pBS-PR1019, ATCC č. 40427, byl uložen 12. února 1988.

Kultura Zea mays v suspenzi, 6-2717-GC, ATCC č. 40326, byla uložena 20. května 1987.

Plasmid pBS-Gluc39.1, ATCC č. 40526 byl uložen 29. prosince 1988.

Plasmid pBS-Gluc.39.3, ATCC č. 40527, byl uložen 29. prosince 1988.

Plasmid pBScucchi/chitinase, ATCC č. 40528, byl uložen 29. prosince 1988 a

plasmid pBSGL6e, ATCC č. 40535, byl uložen 18. ledna 1989.

K. Shrnutí experimentálních protokolů

Chimérní geny podle vynálezu obsahují chemicky regulovatelné řetězce DNA z různých zdrojů, přírodních nebo syntetických, v kombinaci s jedním nebo větším počtem transkribovatelných řetězců DNA. Obvykle dojde k translaci alespoň části transkribovatelného řetězce do fenotypického jevu, přestože vynález zahrnuje také chimérní geny, jejichž činnost se zakládá na protismyslném mechanismu. Následující popis a řada příkladů se týká chemicky regulovatelných řetězců DNA, které se vyskytují přírodně v genomu rostlin, vynález se však týká také těch řetězců, které se vyskytují v jiných přírodních systémech, například bakteriální, virový nebo živočišný, je dobře známa řada způsobů pro izolaci těchto řetězců z jejich přirozených systémů. Mimo to zahrnuje vynález také řetězce, odvozené od syntetických nebo jiných systémů nepřirodního původu.

Chemicky regulovatelné řetězce DNA se izolují ze zdroje v němž existují přírodně nebo synteticky a v případě potřeby je možné je charakterizovat běžnými postupy. V případě, že se řetězec DNA izoluje z přírodně se vyskytujícího genu, je tento gen aktivován příslušným regulátorem, a to buď chemickým nebo jiným známým regulátorem genů, RNA, která je důsledkem této

aktivace se izoluje a užije se ke konstrukci sestavy cDNA. Tato sestava se pak užije pro diferenciální sledování při použití radioaktivně značené cDNA, vzniklé jak z 1) RNA, izolované z aktivovaného systému, tak z 2) RNA, izolované z druhého systému, který nebyl aktivován regulátorem. Toto diferenciální sledování tvoří zvláštní hledisko vynálezu, jak již bylo svrchu uvedeno. Klony, které obsahují chemicky regulovatelnou cDNA se pak izolují a jejich sled se s výhodou stanoví v tomto okamžiku. Klony cDNA se pak užijí k identifikaci a izolaci klonu genomu ze sestavy genomu, přičemž uvedený klon genomu obsahuje chemicky regulovatelný řetězec DNA. Tento gen se s výhodou podrobí stanovení sledu a chemicky regulovatelný řetězec DNA se funkčně mapuje subklonováním fragmentů tohoto genu, s jejich následným navázáním na jiný gen a vyhodnocení jejich účinnosti v transgenickém rostlinném materiálu nebo v přechodném systému pro expresi v rostlinách.

Pro geny bílkovin PR tabáku je možno zkonstruovat genomickou sestavu lambda při použití běžných postupů a klony, které obsahují chemicky regulovatelný řetězec DNA se identifikují a čistí. Jeden z těchto klonů byl charakterizován. Byly identifikovány i fragmenty po působení restričních enzymů, které obsahují chemicky regulovatelné řetězce DNA. Pro gen PR-la tyto fragmenty genu zahrnují fragment ClaI o

20 000 párech bazí, fragment HindIII o 6500 párech bazí a fragment EcoRI o 3600 párech bazí. Fragment Hind III obsahuje přibližně 500 kódových párů bazí a přibližně 6000 nekódových bazí v oblasti 5', přiléhající k přechodnému počátku. Některé z těchto fragmentů byly subklonovány do plasmidů pro použití jako zdroje DNA pro další subklonování a pro úplnou charakterizaci, to znamená pro tvorbu mapy míst působení restričních enzymů, pro analýzu řetězce DNA a pro identifikaci počátku transkripce genu. Pro gen PR-la byl přímo subklonován z lambda genomového klonu fragment EcoRI o 3600 párech bazí a pak byl dále subklonován až do konečného klonu s obsahem přibližně 1200 párů bazí, ohraničených místy působení restričních enzymů XhoI a PstI. Tento klon obsahuje chemicky indukovatelný řetězec DNA z genu PR-la a část přilehlé kódové oblasti tohoto genu. Tato část obsahuje kódový řetězec pro signální peptid genu pro bílkovinu PR-la.

Byly izolovány také klony genomu, které jsou kódem pro zásaditou formu 8-1,3-glukanázy. Byly charakterizovány dva klony 39.1 a 39.3 a byly také identifikovány fragmenty po působení restričních endonukleáz, které obsahují chemicky regulovatelné řetězce DNA.

Při použití vektorů podle vynálezu je možno použít tyto klony pro přípravu chimérních genů, které sestávají ze tří částí, jak bylo svrchu uvedeno. Tyto chimérní řetězce DNA obsahují chemicky regulovatelný řetězec, část transkribovatelného řetězce DNA a třetí řetězec DNA z cizorodého zdroje. Je možno také postupovat tak, že klony jsou dále poněkud pozměněny, například cílenou tvorbou mutací tak, aby bylo možno odstranit celý nebo většinu kódového fragmentu původního genu před jeho spojením s kódovým sledem z cizorodého zdroje za vzniku dvoudílného chimérního genu, tak jak byly svrchu popsány. Ve výhodném provedení ta část chimérního genu, která nepředstavuje chemicky regulovatelný řetězec tvoří gen pro snadno pozorovatelný nebo zjistitelný fenotypický jev. V následujících příkladech jsou podrobněji ilustrovány geny pro β -1,3-glukuronidázu, pro tzv. divoký typ a pro acetoxy kyselinu (její syntetázu) vytvářející odolnost proti herbicidům a pro endotoxin *Bacillus thuringiensis*, je však možno předpokládat možnou tvorbu dalších podobných genů tohoto typu, jak již bylo svrchu uvedeno. V dalším výhodném provedení je kódová složka řetězce DNA chimérního genu kódem pro toleranci nebo pro odolnost proti herbicidům nebo pro odolnost proti napadení hmyzem. Toto provedení je rovněž ilustrováno uvedenými geny pro syntetázu acetoxykyseliny a pro endotoxin *Bacillus thuringiensis*.

Chimérní geny a vektory, které tyto chimérní geny obsahují, je možno včlenit do rostlinných buněk různými postupy, které dávají vznik transformovaným buňkám, tkáním a rostlinám nebo buněčným kulturám, které je možno využít v biologických reaktorech.

V příkladové části je popsána podrobněji řada postupů, které jsou určeny pro jednoděložné i dvouděložné rostliny. Některé z těchto postupů, které jsou uvedeny k jasnějšímu výkladu celého postupu tvoří předmět jiných patentových přihlášek, zejména US patentové přihlášky č. 056 506, podané 29. května 1987 a US patentové přihlášky č. 165 665, podané 8. března 1988.

Transformovaný rostlinný materiál je pak možno zpracovávat působením chemického regulátoru a pak pozorovat a/nebo měřit expresi genu pro fenotypický jev. Tento typ systému poskytuje možnost snadné selekce a identifikace řídící účinnosti určitých chemických regulátorů. Vynález se rovněž týká zlepšeného průkazu účinnosti enzymu β -1,3-glukonamidázy (GUS), který umožňuje vyšetřit velké množství vzorků s vysokou přesností a v krátkém časovém období. Tento průkaz v podstatě spočívá v reakci extraktů rostlinné tkáně ve vzorcích s objemem nižším než 0,5 ml s 1,5 až 3 mmol 4-methylumbelliferylglukuronidu při teplotě přibližně 37 °C po dobu 1 až 5 hodin s následným stanovením koncentrace uvolněného fluorescenčního indikátoru.

Kvantitativní stanovení úrovně RNA je základním stupněm při analýze exprese genu. K tomuto účelu byly vyvinuty speciální metody, při nichž se na gen naváže další řetězec, nazývaný primer. Při tomto postupu se oligonukleotid, specifický pro určitý gen radioaktivně označí, pak se tento oligonukleotid hybridizuje se vzorkem RNA a hybrid se podrobí působení reversní transkriptázy. Takto prodloužené produkty se oddělí na akrylamidovém gelu, a sledují se autoradiograficky. Výhoda tohoto postupu ve srovnání se známými postupy spočívá ve snadnosti přípravy sondy, jednoduchosti provedení celého postupu a zkrácení doby, jíž je zapotřebí k provedení celé zkoušky. Tento postup je stejný sensitivní a kvantitativní jako mapování S1.

V případě, že se svrchu uvedený postup aplikuje za určitých zvláštních reakčních podmínek, které budou dále popsány v příkladové části přihlášky na stanovení PR-1 mRNA, je možno jej s výhodou užít ke stanovení této mRNA v celkové RNA v extraktu z tabákových listů, infikovaným virem tabákové mozaiky. PR-1 mRNA se při expresi tvoří v množství 1 % celkové mRNA^v/těchto listech, jak bylo prokázáno kvantitativní analýzou při použití svrchu uvedeného postupu a frekvencí klonů cDNA v sestavě cDNA, která byla odvozena od uvedené RNA. Zlepšení, které přináší způsob podle vynálezu ve srovnání

s dříve známými postupy spočívá ve značení oleonukleotidu na vysokou specifickou odchylku, ve snížení molárního množství sondy, kterého je zapotřebí užít při provádění uvedeného postupu (typicky přibližně 0,01 až 0,05 pmol), v optimalizaci hybridizace a v optimalizaci koncentrace nukleotidtrifosfátu.

Vynález se tedy rovněž týká způsobu stanovení množství specifické RNA v roztoku RNA, postup spočívá v tom, že se

- a) značí oligonukleotid, specifický pro RNA (primer) o délce 12 až 18 nukleotidů na vysokou specifickou aktivitu radioaktivity,
- b) RNA se značením oligonukleotidem se hybridizuje v koncentraci v rozmezí 0,1 až 20 nM v rozmezí 2 minuty až 24 hodin při teplotě přibližně 37 °C,
- c) primer se prodlouží působením reversní transkriptázy za přítomnosti nukleotidtrifosfátů při koncentraci 0,003 až 1 mmol po dobu 1 až 120 minut a
- d) produkty s prodlouženým řetězcem se oddělí a znázorní se autoradiograficky.

Praktické provedení vynálezu bude znázorněno následujícími příklady.

L. P ř í k l a d y

Enzymatické reakce v příkladové části se provádějí podle doporučení výrobce, není-li uvedeno jinak. Chimérní geny a vektory podle vynálezu byly zkonstruovány pomocí postupů, které jsou v oboru dobře známy. Vhodné postupy byly popsány například v publikaci Maniatis T. a další, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982), *Methods in Enzymology*, sv. 68, 100, 101 a 118 (1979, 1983, 1983 a 1986) a *DNA Cloning*, Glover D. M., Ed. IRL Press, Oxford (1985). Složení jednotlivých prostředí bylo popsáno v publikaci Miller J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972), stejně jako ve svrchu uvedených publikacích.

Dále budou vysvětleny zkratky, užité v příkladové části přihlášky:

ATP	adenosintrifosfát
bp	pár bazí
CETAB	hexadecyltrimethylammoniumbromid
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxycetové
DTT	dithiothreitol
dicamba	kyselina 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová
EDTA	kyselina ethylendiamin N,N',N'-tetraoctová

kb	tisíc párů bazí
MES	kyselina 2-(N-morfolin)ethansulfonová
MU	4-methylumbelliferylglukuronid
PEG	polyethylenglykol
picloram	kyselina 4-amino-3,5,6-trichlorpikolinová
SDS	dodecylsíran sodný
TFA	kyselina trifluoroctová
TMV	virus mozaiky tabáku
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)methylaminhydrochlorid.

Prostředí

Prostředí SH-0: prostředí, uvedené v publikaci Schenk R.U. a další, Can, J. Bot., 50, (1972) 199 - 204; bez hormonů. Prostředí může být kapalně nebo může být zpevněno 0,8 % agaru nebo 0,5 % prostředku GelRite^R. Prostředí se sterilizuje obvyklým způsobem působením tepla v autoklávu 15 až 20 minut při teplotě 110 až 120 °C.

Prostředí SH-30: Jde o prostředí SH-0, které obsahuje 30 μ M Dicamba.

Prostředí SH-45: Jde o prostředí SH-0, které obsahuje 45 μ M Dicamba.

Prostředí RY-2: Toto prostředí bylo popsáno v publikaci Yamada Y. a další, Plant Cell. Reports, 5, 85 - 88 (1986).

OMS - prostředí: Toto prostředí bylo popsáno v publikaci Murashige T. a Skoog F., Physiologia Plantarum 9, 473, (1968). Toto prostředí je možno zpevnit přidáním 0,8 % agaru nebo agarosy nebo přidáním 0,5 % GelRite^R.

V následující tabulce je uvedeno složení použitých prostředí. Makroelementy^a, mikroprvky^a a Fe-EDTA jsou použity tak, jak je uvedeno v literatuře. Prostředí KM podle publikace Kao K.N. a další, Planta 126, 105 - 110 (1965). Prostředí N6 podle publikace Chu a další, Scientia Sinica 18, 659 (1975).

T a b u l k a I

prostředí	KM-8p ^{b,c,d}	N6
organické látky a vitaminy ^e (mg/l)		
biotin	0,01	
pyridoxin-HCl	1,00	0,5
thiamin-HCl	10,00	0,1
nikotinamid	1,00	
kyselina nikotinová	0,10	0,5
kyselina listová	0,40	
D-Ca-pantotenát	1,00	

Tabulka I - pokračování

prostředí	KM-8p ^{b,c,d}	N6
kyselina p-aminobenzoová	0,02	
cholinchlorid	1,00	
riboflavin	0,20	
vitamín B ₁₂	0,02	
glycin	0,10	2,0
cukry a alkoholy cukrů (g/l)		
sacharóza	0,25	30,0
glukóza	68,40	
mennitol	0,25	
sorbitol	0,25	
cellobiosa	0,25	
fruktóza	0,25	
mannosa	0,25	
rhamnosa	0,25	
ribosa	0,25	
xylosa	0,25	
myoinositol	0,10	
konečné pH	5,8	6,6
sterilizace	filtr	autokláv

Vysvětlivky:

- a makroelementy se obvykle užívají ve formě zásobního roztoku s desetinásobnou koncentrací, mikroelementy ve formě zásobního roztoku s tisícinásobnou koncentrací.
- b Kyselina citronová, fumarová a jablečná (každá v konečné koncentraci 40 mg/l) a pyrohroznan sodný (konečná koncentrace 20 mg/l) se připraví ve formě zásobního roztoku se stonásobnou koncentrací, pH roztoků se upraví na 6,5 přidáním hydroxidu amonného a tento roztok se pak přidává k prostředí.
- c Adenin (konečná koncentrace 0,1 mg/l) a guanin, thymidin, uracil, hypoxanthin a cytosin (každý z nich v konečné koncentraci 0,03 mg/l) se připravují v zásobním roztoku s tisícinásobnou koncentrací, roztoky se upravují na pH 6,5 přidáním hydroxidu amonného a pak se přidávají k prostředí.
- d Následující aminokyseliny se přidávají do prostředí při použití zásobního roztoku s desetinásobnou koncentrací, jehož pH bylo upraveno na 6,5 přidáním hydroxidu amonného až do dosažení následujících konečných koncentrací. Glutamin 5,6 mg/l, alanin a kyselina glutamová vždy 0,6 mg/l, cystein 0,2 mg/l, asparagin, kyselina asparagová, cystin, histidin, isoleucin, leucin,

lysin, methionin, fenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin vždy 0,1 mg/l.

- ^e Zásobní roztok vitamínů se obvykle připravuje ve stonásobné koncentraci.

M a t e r i á l y

Agarosa: Příprava a čištění agarosy bylo popsáno v publikaci Guiseley a Ren "The Agarosa Monograph", Marine Colloids Division FMC Corp., 1975. Agarosa je jednou ze složek agaru. Běžně obchodně dodávaný agar obvykle sestává ze směsi neutrální agarosy a iontového agaropektinu s velkým počtem vedlejších skupin. Obvykle zůstává určitý počet postranních řetězců intaktní a určuje fyzikálně chemické vlastnosti agarosy, jako jsou tvorba gelu, teplota tání. Jako činidla pro ztuhnutí živných prostředí je výhodná agarosa s nízkou teplotou tání, která se dodává například pod obchodním názvem SeaPlaque^R.

Hydrolysát kaseinu: Hydrolysát kaseinu je enzymatický hydrolysát z krvaského mléka, použit byl typ 1, Sigma Co., P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA.

Celluláza RS: Cellulase RS, Yakult Hosha Co. Ltd., 1.1.19
Higashi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo, 105 Japonsko.

GelRite^R: GelRite Gellan Gum, Scott Laboratories Inc.,
Fiskerville, R.I. 02823, USA.

GeneScreen Plus^R: Cat. No. NEF 976, NEN Research Products,
549 Albany St., Boston, MA 02118, USA.

IBI Random Primer Kit: "Prime Time" sestava, Internatio-
nal Biotechnologies Inc., P.O. Box 1565, New Haven, CT
07606, USA.

Nalgen^R Filtr: Nalge Co.,n Division of Sybron Corp.
Rochester, N.Y., 14602, USA.

Pectolyase Y-23^R: Seishin Pharmaceutical Co., Ltd., 4-13
Koami-cho, Nihonbashi, Tokyo, Japnsko.

Parafilm^R: Parafilm^R je laboratorní film- American Can
Co., Greenwich, CT 06830, USA.

SSC: 1,54 mM chloridu sodného, 0,154 mM citronanu sodného.

Sloupec pro spin: Sloupec, předem naplněný materiálem
Sephadex G25, Cat. No. 100402, Boehringer Mannheim Bio-
chemicals, Biscataway, N.Y., USA.

Pufr TAE a TBE: Tris-acetátový pufr a Tris-boritanový pufr, jde o běžné pufry pro použití při elektroforéze, uvedené ve svrchu zmíněné Maniatisově publikaci.

1. Obecné postupy

V této skupině příkladů se popisují obecné manipulace, kterých se pak užívá při provádění dalších příkladů, v nichž se postupy vysvětlují podrobněji.

P ř í k l a d 1

Vazba v agaroze

Po rozštěpení plasmidové DNA působením restričních enzymů a po elektroforetickém oddělení vzniklých fragmentů na gelu TAE s nízkou teplotou tání se pásy, které obsahují příslušné fragmenty přesně vyříznou a zahřejí se na teplotu 65°C k roztavení agarozy. Pak se 2 až 5 μ l tohoto materiálu přidá k 15 μ l vody a roztok se nechá stát při teplotě 65°C ještě 10 minut. Pak se tento roztok zchladí na teplotu 37°C a nechá se stát 5 minut k vyrovnání teplot. Pak se přidají 2 μ l desetinásobné koncentrace pufru pro působení ligázy (200 mM Tris, pH 8,0, 100 mM chlotisu hořečnatého, 100 mM BTT, 10 mM ATP) spolu s 1 μ l

T4 DNA ligázy (New England BioLabs) a tento roztok se nechá ztuhnout a pak se inkubuje přes noc při teplotě 15°C.

P ř í k l a d 2

Transformace z agarozy

Agarozu, obsahující příslušnou DNA se roztaví inkubací po dobu 10 minut při teplotě 65°C. Pak se 10 µl tohoto roztoku přidá ke 30 µl pufru TE (10 mM Tris o pH 7,5, 1 mM EDTA), a po smísení se směs nechá stát při teplotě místnosti. Zmrazlé buňky *E. coli* se uloží na navlhčený led k roztátí. Zředěný roztok DNA se přidá ke 200 µl buněk a směs se nechá stát 20 minut na ledu. Pak se buňky s obsahem DNA zpracují tepelným šokem při teplotě 41°C po dobu 90 sekund. Po této době se buňky nechají stát při teplotě místnosti 10 minut a pak se přidá 0,8 ml prostředí SOC, jehož složení je uvedeno v publikaci Hanahan D., J. Mol. Biol. 166, 557-580, 1983 a kultura se hodinu inkubuje při teplotě 37°C. Pak se 100 µl této kultury nanese na plotny LB (ze svrchu uvedené publikace Millerovy) s obsahem 100 µg/ml ampicillinu (L-amp) a pak se plotny inkubují přes noc při teplotě 37°C. Positivní kolonie se oddělí a znovu se formou nátěru přenesou na další plotnu L-amp, která se opět inkubuje přes noc při teplotě 37°C.

P ř í k l a d 3

Metoda southern blot

3 μ g DNA tabáku se rozštěpí působením různých restrikčních enzymů za podmínek, udaných dodavatelem. DNA se extrahuje fenolem, vysráží se ethanolem a pak se znovu uvede do suspenze v pufru pro nanesení do gelu (15% ficoll, 0,025 % bromfenolové modři, 10 mM EDTA, pH 8). Vzorky se pak nanesou na 0,5 % agarozový gel a elektroforézy se provádí při gradientu 5V/cm tak dlouho, až bromfenolová modř dosáhne konce gelu. Pak se DNA přenesse na Gene-Screen Plus (DuPont) při použití alkalického způsobu přenosu tak, jak je doporučováno dodavatelem. Předběžná hybridizace, hybridizace a promývání se provádí rovněž podle doporučení výrobce. Hybridizace se pak sleduje autordiograficky.

P ř í k l a d 4

Molekulární adaptory

Typickým molekulárním adaptorem je řetězec●●

5' - GGGATCCCTGCA - 3'

pro přeměnu místa působení enzymu PstI na místo působení enzymu BamHI. Tato molekula je syntetizována v zařízení Applied Biosystems Synthetizer při použití B-cyanoethyl-fosforamiditu a čistí se vysokotlakou kapalinovou chromatografií v reversní fázi. Přibližně 2 μ g tohoto oligonukleotidu se pak zpracuje působením kinázy podle svrchu uvedené publikace Maniatis a dalších, str. 125. Roztok oligonukleotidu se pak zahřeje na vodní lázni na teplotu 65°C a pak se nechá zchladnout na teplotu místnosti v průběhu 30 minut. Přibližně desetinásobný přebytek tohoto molekulárního adaptoru se po uvedeném tepelném zpracování přidá k rozštěpené DNA spolu s 10x pufrem pro ligázu, T4 DNA ligázou a příslušným množstvím vody. Typická reakce má následující složení:

DNA	1-2 μ l (přibližně 1 pmol)
adaptor	1 μ l (přibližně 10 pmol)
10x pufr pro ligázu	1 μ l
T4 DNA ligáza	1 μ l
voda	5-6 μ l

Tento roztok se inkubuje celkem 30 minut při teplotě 12 až 15°C a pak se zahřívá 30 minut na teplotu 65°C k inaktivaci ligázy. Koncentrace soli a objem se upraví a adaptovaná DNA se rozštěpí tak, aby byl uvolněn adaptor i s příslušným zakončením. Nevčleněný adaptor se

odstraní buď elektroforézou na agarozovém gelu nebo postupným vysrážením isopropanolem.

P ř í k l a d 5

Mapování prodloužených primerů

A. Syntéze a značení primerů na 5'-zakončení pro prodloužení

Následující oligomery pro použití jako primery byly syntetizovány při použití zařízení Applied Biosystems Synthetizer a β -cyanoethylfosfoamiditu:

PR-1: 5'-ATAGTCTTGTTGAGAGTT - 3'

GUS: 5'- TCAGGGTTGGGGTTTCTAC - 3'

AHAS: 5'- AGGAGATGGTTTGGTGGA - 3'

BT: 5'- ATACGTTCTACTATCATAGT - 3'

Oligonukleotidy se čistí vysokotlakou kapalinovou chromatografií v reversní fázi (HPLC). 5 pmol každého oligonukleotidu se podrobí působení kinázy podle svrchu uvedené publikace Maniatis a dalších, str. 125 při použití 200 μ C 32 P-ATP (600 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l). Po

inkubaci při teplotě 37⁰ C po dobu 30 minut se reakční směs zředí na objem 100 μ l, extrahuje se směsí fenolu a chloroformu a pak se třikrát vysráží při použití 50 μ g RNA na nosiči. Konečná sraženina se uvede znovu do suspenze v pufru pro reversní transkriptázu (50 mM Tris-HCl o pH 7,5, 40 mM chloridu draselného a 3 mM chloridu hořečnatého) v koncentraci 2 nM. Specifická aktivita značeného oligonukleotidu je přibližně 3×10^6 Cvpmpmol.

B. Příprava RNA

RNA se připravuje v podstatě způsobem, který byl popsán v publikaci Lagrimini L.M. a další, Proc. Natl. Acad. Sci USA 84, 7542 (1987). Tkáň se drtí v kapalném dusíku v misce s použitím tlouku. K mleté tkáni se přidá pufr (podle Lagriminiho ve svrchu uvedené publikaci) při použití 2,5 pufru na 1 gram drcené tkáně. Pak se přidá stejné množství fenolu a směs se opatrně míchá 15 minut. Fáze se oddělí odstředěním a vodná fáze se odloží. RNA se vysráží přidáním octanu sodného do koncentrace 0,3 M a 2,5 objemu ethanolu. Sraženina se pak oddělí odstředěním a znovu se uvede do suspenze ve 2 ml sterilní vody. Pak se přidá chlorid lithný do konečné koncentrace 3M a směs se nechá stát přes noc při teplotě 4⁰ C. Pak

se sraženina oddělí odstředěním a usazenina se promyje směsí ledově chladného 80% ethanolu a vody. Pak se usazenina usuší a znovu se uvede do suspenze v 500 μ l sterilní vody. Koncentrace této RNA se stanoví spektrofotometricky. Alternativně je také možno extrahovat RNA z kalu svrchu uvedeným způsobem s tím rozdílem, že se tkáň kalu rozřeže na krychličky o délce hrany přibližně 3 mm, tkáň se vloží do předem zchlazené třecí misky s tloučkem pro drcení tkáně v kapalném dusíku před polytronovým stupněm.

Prodloužení primeru

50 μ g celkové RNA se lyofilizuje v Eppendorfově zkumavce s objemem 500 μ l. RNA se znovu uvede do suspenze ve 30 μ l roztoku radioaktivně značené sondy a zahřeje na 10 minut na teplotu 70°C. Pak se zkumavka pomalu zchladí na teplotu 37°C a nechá se inkubovat přes noc. Pak se bez jejího odstranění z lázně o teplotě 37°C přidá 10 x pufr pro reversní transkriptázu (500 mM Tris-HCl o pH 7,5, 400 mM chloridu draselného, 30 mM chloridu hořečnatého), 1 μ l 5 mg/ml sérového albuminu skotu, 5 μ l 100 mM dithiothreitolu, 5 μ l 10 x dNTP (10mM každého dNTP ve vodě), 3 μ l vody, 2 μ l RNasin (80 jednotek) a 2 μ l reversní transkriptázy (400 jednotek) a pak se reakční směs inkubuje 30 minut při teplotě 37°C. K ukončení re-

akce se přidá 5 μ l octanu sodného o koncentraci 3M o pH 5 a 150 μ l absolutního ethanolu. Zkumavka se pak ponechá 30 minut při teplotě -20°C , vytvořená sraženina se oddělí odstředěním, promyje se 80% ethanolem a usuší se na vzduchu. Pak se sraženina znovu uvede do suspenze v 10 až 20 μ l barviva (90 % formamidu, 0,05 % bromfenolové modři, 0,05 % xylencyanolu a 1 mM EDTA) a produkty prodloužení se oddělí na 6% gelu způsobem podle svrchu uvedené publikace Maniatis a dalších. Produkty tohoto prodloužení se pak vizualizují autoradiograficky.

P ř í k l a d 6

Mapování při použití S1 nukleázy

Plasmid pBS1013Cla se rozštěpí enzymem SfaNI, defosforyluje se působením fosfatázy z telecího střeva a pak se uvede do styku s ^{32}P -ATP a kinázou. Směs se extrahuje fenolem, DNA se vysráží ethanolem a pak se rozštěpí působením enzymu BstEII a fragment o 300 pb od 750 do 1035 na obr. 1 se izoluje po elektroforéze na agarozovém gelu s nízkou teplotou tvorby gelu. Sonda se uvede znovu do suspenze v pufru pro hybridizaci za použití formamidu podle publikace Berk A.J. a další, Cell 12, 721

(1977) v koncentraci přibližně 2 nM. Specifická aktivita sondy je přibližně 5×10^5 Cvpmpmol.

50 μ g celkové lyofilizované RNA se rozpustí ve 30 μ l roztoku sondy a zkumavky se zahřejí na teplotu 65°C na dobu 10 minut, načež se nechá hybridizace probíhat přes noc při teplotě 48°C. Pak se provádí zpracování působením nukleázy S1 a elektroforéza na gelu popsaným způsobem při použití koncentrace S1 nukleázy 400 jednotek/ml a teploty při inkubaci 30°C. Příslušná koncentrace S1 nukleázy se stanoví v předběžných pokusech.

P ř í k l a d 7

Mapování místa pro počátek transkripce

Místo pro počátek transkripce genu PR-la se stanoví kombinací mapování pomocí S1 nukleázy a analýzy prodloužením primeru. Byl zkoumán autoradiogram prodloužení primeru při použití RNA, izolované z listů tabáku, infikovaných virem mozaiky tabáku nebo subklonu mpl9 fragmentu XhoI-PstI jako templátu a oligonukleotidu s obsahem 17 bází, komplementárního s polohami 1025 až 1042 řetězce genu PR-la jako specifického primeru. Primer byl značen

na 5'-fosfátu, takže velikost produktu prodloužení bude tožná s velikostí odpovídajícího pásu při analýze sledu. Přítomnost dvou silných pásů, které odpovídají polohám 902 a 903 a slabého pásu v poloze 901 klonu genomu je možno vysvětlit pravděpodobně přítomností počátku transkripce v některé z těchto poloh. Analýze prodloužením primeru však není sama o sobě použitelná pro identifikaci 5'-zako-
nčení mRNA. Například mRNA může obsahovat 5'-zakončení, které bylo posunuto z místa, nacházejícího se dále směrem vzhůru.

Aby bylo možno skutečně stanovit 5'-zakončení je zapotřebí použít mapování S1 nukleázou ve spojení s prodloužením primeru. Fragment po působení enzymu SfaNI byl označen na 5'-zakončení a byl rozštěpen působením enzymu BstEII za vzniku sondy se specifickým řetězcem z polohy 759 do polohy 1040. Tato sonda byla použita k mapování 5'-zakončení genu PR-1a a jeho transkriptů do RNA, izolované z listů tabáku, infikovaných virem mzaiky tabáku. Hlavní pás o 137 ± 2 baze odpovídá polohám 901 až 905 klonu genomu. V pokusech s nukleázou S1, v nichž je zapotřebí dosáhnout dobrého dělení jsou produkty štěpení podrobeny elektroforéze spolu se standardem, jehož délka je známa. Při tomto postupu byly vizualisovány tři pásy, které odpovídaly polohám 901, 902 a 903. Tyto výsledky potvrzují, že

analýza prodloužením primeru byla správná a umisťují 5'-zakončení mRNA pro gen PR-1a do polohy 901, 902 nebo 903. S ohledem na počátek transkripce je jedním z možných vysvětlení těchto výsledků, že RNA polymeráza může začínat transkripce na kterékoliv z bazí v polohách 901, 902 a 903 s pravděpodobně přibližně stejnou pravděpodobností. Avšak vzhledem k tomu, že při eukaryotické transkripci je obvykle dávana přednost na iniciaci transkripce na A, je pravděpodobnějším vysvětlením pro jevíci se vícečetné 5'-zakončení skutečnost, že mRNA pro PR-1a začíná v poloze 903 (A) a každá z mRNA pro geny PR-1b a PR-1c začíná v ostatních polohách odpovídajících genů.

2. Identifikace a charakterizace bílkovin

Bílkoviny PR byly izolovány, čištěny a byl určen jejich řetězec, v některých případech poprvé, v jiných v souladu se známými údaji v literatuře. Pokusy byly prováděny proto, aby bylo možno s konečnou platností potvrdit totožnost jejich chemicky indukovatelných genů.

P ř í k l a d 8

Čištění bílkovin PR-1a a PR-1b

Rostliny *Nicotiana tabaccum* cv. Xanthi byly pěstovány ve skleníku a byly infikovány ve stáří 8 týdnů tak, že listy byly opatrně promnuty se suspenzí běžného kmene (UI) viru mozaiky tabáku (0,5 µg/ml). Listy byly sklizeny 7 dnů po infekci a intracelulární kapalina (ICF) byla z listů vymyta a shromážděna způsobem, který byl popsán v publikaci Parent J.G. a další, Can. J. Bot. 62, 564 (1984). 250 ml ICF bylo koncentrováno na 50 ml lyofilizací a pak bylo toto množství nanášeno na sloupec s náplní Ultragel ACA54 v rovnovážném stavu v Tris-HCl o pH 8,8 s 1 mM EDTA. Eluáty byly analyzovány elektroforézou na 10% polykrylamidových gelech. Frakce s obsahem bílkovin PR-1 byly slity, lyofilizovány, znovu uvedeny do suspenze ve 3 ml vody a pak dialyzovány přes noc proti vodě. Takto získané materiály byly dále čištěny vysokotlakou kapalinovou chromatografií při použití eniontoměniče na sloupci TSK-DEAE 5PN. Sloupec byl vymýván gradientem 0 až 0,6 M chloridu sodného v 50 mM Tris-HCl o pH 8,0 s 1 mM EDTA. Frakce byly analyzovány elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (PAGE). Ze sloupce se nejprve vymývá PR-1b

při 0,18 M NaCl, PR-1a se vymývá při 0,28 M NaCl. Frakce s obsahem jednotlivých bílkovin se slijí, dialyzují proti vodě a lyofilizují. Čistota bílkovin PR-1a a PR-1b byla potvrzena vysokotlakou kapalinovou chromatografií v reversní fázi při použití sloupce Aquapore phenyl (2,1 x 100 mm, Brownlee), sloupec byl vymýván lineárním gradientem směsi acetonu a isopropanolu v poměru 1 : 1 (5 až 80 % v o,1% kyselině trifluoroctové.

P ř í k l a d 9

Stanovení řetězce bílkovin

Čištěná, lyofilizovaná bílkovina PR-1a se rozpustí v 6M guanidin-HCl s obsahem 1 M Tris-HCl o pH 8,6 s 10 mM EDTA. Pak se přidá dithiothreitol do koncentrace 20 mM a 4-vinylpyridin do konečné koncentrace 50 mM. Pak se vzorek inkubuje 1 1/2 hodiny v dusíkové atmosféře. Pyridylethylovaný materiál se pak zbaví solí na sloupci Aquapore phenyl vysokotlakou kapalinovou chromatografií (2,1 x 10 cm, Brownlee). Sloupec se vymývá lineárním gradientem (5 až 80 % směsi acetonitrilu a isopropa-

nolu v poměru 1 : 1 v 0,1% kyselině trifluoroctové (TFA).

Automatická Edmanova degradace se provádí při použití automatického zařízení (Applied Biosystems 470A) v plynové fázi. Phenylthiohydantoinové aminokyseliny byly stanoveny rovněž analyzátozem (Applied Biosystems 120A PTH).

Štěpení bromkyanem se provádí in situ způsobem podle publikace Simpson R.J. a další, Biochem. Intl 8, 787 (1984). Štěpení PR-1 působením pyroglutamát-aminopeptidázy (Boehringer Mannheim) se provádí podle publikace Allen G., Plant. Sci. Lett. 26, 173 (1982).

PR-1a se štěpí endoproteinázou Lys-C (Boehringer Mannheim) v 0,1 M TrisHCl o pH 8,5 po dobu 24 hodin při teplotě místnosti při použití poměru enzymu k substrátu 1 : 10. Peptidy se izolují vysokotlakou kapalinovou chromatografií při použití sloupce Aquapore C-8 (1 x 22 cm, Brownlee) při použití lineárního gradientu 0 až 60 % směsi acetonitrilu a isopropanolu v objemovém poměru 1 : 1 v 0,1% TFA.

Štěpení N-terminálního Lys-C peptidu působením trypsinu (Cooper) se provádí v 0,1 M hydrogenuhličitanu amonném o pH 8,2 s obsahem 0,1 M chloridu vápenatého po dobu 5 hodin při teplotě 37° C při použití poměru

enzymu k substrátu 1 : 100. Dva vzniklé peptidy se od-
dělí vysokotlakou kapalinovou chromatografií při použi-
tí týchž podmínek jako v případě peptidů Lys-C.

P ř í k l a d 10

Bílkovinný řetězec peptidů PR-la

Korelace řetězce DNA tří klonů cDNA
s bílkovinami PR-la, PR-lb a PR-lc byla původně uveřej-
něna ve svrchu uvedené publikaci Cornelissen, B.J.C a
další, a byla založena na srovnání dříve uveřejněného
bílkovinného řetězce tří peptidů, odvozených od PR-la,
který byl uveřejněn v publikaci Lucas J. a další, EMBO J.
4, 2745 (1985) a primární struktury bílkovin, která byla
odvozena od klonů cDNA. Klony cDNA, označené jako PR-la
jsou však zkráceny na 5'-zakočení a je možno je srovná-
vat pouze se dvěma z uvedených tří peptidů. Řetězec ami-
nokyselin, odvozený od cDNA byl připraven a analyzován a
bylo prokázáno, že řetězec cDNA pro PR-la, uvedený ve
svrchu uvedené publikaci Pfitzner U.M. a další, nejen
neodpovídá uveřejněnému řetězci bílkovin v místě tripto-
fanového zbytku, avšak neodpovídá také na třech dalších
polohách aminoterminálního zakončení bílkovinného řetězce.

Tato anomálie zpochybňuje identifikaci tohoto klonu jako PR-la. Z tohoto důvodu byla totožnost klonu tobchrPR1013 jako genu pro PR-la ověřena stanovením velké části primární struktury čištěné bílkoviny PR-la zjištěním řetězce aminokyselinových zbytků.

Řetězec aminokyselin pro bílkovinu PR-la pak byl srovnán s řetězcem aminokyselin, který byl odvozen od klonů cDNA pro PR-la, PR-lb a PR-lc. Řetězce cDNA, tak jak byly analyzovány z uvedených cDNA klonů a tak, jak byl jejich řetězec stanoven ve svrchu uvedené publikaci Pfitzner U.M. a další, souhlasí ve všech polích. Bylo stanoveno více než 80 % řetězce úplné bílkoviny PR-la a bylo prokázáno, že tento řetězec je v souladu s odvozeným řetězcem bílkoviny pro tobchrPT1013. V případě, že se srovnává odvozený řetězec aminokyselin z klonů cDNA pro PR-lb a PR-lc, tak jak bylo uvedeno ve svrchu zmíněné publikaci Cornelissen B.J.C. a další, je možno prokázat šest nebo sedm míst, které nejsou v souladu. Je tedy možno považovat za prokázané, že klon tobchrPR1013 je skutečně klonem genu PR-la.

3. Produkce klonů

V následující skupině příkladů budou popsány klony, které byly připraveny v důsledku

isolace genu a indentifikace chemicky regulovatelných řetězců a chimérních genů, které tyto řetězce obsahovaly.

P ř í k l a d 11

Příprava tobchrPR1013

Z listů *Nicotiana tabaccum* byla izolována jádra tak, že 35 g tkáně bylo nejprve zmrazeno v kapalném dusíku a pak rozdrceno na jemný prášek pomocí třecí misky a tlouku. Získaný prášek byl přidán ke 250 ml pufru (0,3 M sacharózy, 50 mM tris pufru o pH 8, 5 mM chloridu hořečnatého, 5 mM hydrogensířičitanu sodného a 0,5 % NP40) a směs se míchá v ledu 10 minut. Pak se směs zfiltruje přes šest vrstev mulu a kapalina se přenese do nádobek pro odstřeďování a odstřeďuje se 10 minut při 700 g. Usazeniny se znovu uvedou do suspenze v tomtéž pufru a znovu se odstředí. Pak se usazeniny znovu uvedou do suspenze ve stejném pufru a ještě jednou se odstředí. Pak se usazeniny znovu uvedou do suspenze v tomtéž pufru a suspenze se navrství na 20 ml chladné sacharózy s obsahem 10 mM tris-pufu o pH 8, 1,5 mM chloridu hořečnatého, 140 mM chloridu sodného, 24 % sacharósy

a 1 % NP40. Zkum^aky se pak odstředí 10 minut při 17 000 g. Usazenina v tomto stupni obsahuje převážně jádra a zrnka škrobu. Vysokomolekulární DNA se z jader izoluje způsobem, popsaným ve svrchu uvedené publikaci Maniatis T. a dalších. Tato DNA se částečně rozštěpí enzymem MboI a pak se uloží do místa po štěpení enzymem BamHI ve vektoru EMBL3 pro klonování. Přibližně 300 000 plaků se sleduje pomocí značené sondy cDNA pro PR-1b. Bylo izolováno a charakterisováno 50 pozitivních klonů. Pozitivní plaky se čistí a charakterisují analýzou pomocí restrikčních enzymů. Tyto klony se pak rozdělí do osmi zřetelně oddělených skupin podle míst působení restrikčních enzymů. Jeden z těchto klonů byl identifikován jako tobchrPR1013. Částečná mapa míst působení restrikčních enzymů pro tento klon je znázorněna na obr. 1. Isolace DNA a další manipulace byly prováděny podle svrchu uvedené publikace Maniatis a dalších.

P ř í k l a d 12

Příprava pBS-PR1013Cla

Fragment po štěpení enzymem ClaI z klonu tobchrPR1013 byl subklonován v plasmidu Bluescript

(Stratagene Cloning Systems), za vzniku plasmidu pBS-PR1013Cla, znázorněného na obr. 2. Fragment od 2 kb po štěpení plasmidu pBS-PR1013Cla enzymy XhoI-BglII byl podroben analýze řetězce a byla prokázána, že polohy 913 až 1711 (řetězec 1) přesně odpovídají řetězci klonu cDNA pro PR-la, tak jak byl izolován ve svrhu uvedené publikaci Pfitzner U.M. a další. Možné seskupení DNA tabáku v průběhu klonování je možno předpovídat analýzou restričních fragmentů z DNA genomu. V závislosti na informacích, které byly po řetězci získány a na mapě míst působení restričních enzymů pBS-PR1013Cla by při štěpení DNA genomu tabáku enzymy EcoRI, HindIII, XhoI + BglII nebo HindIII + PstI vzniknou fragmenty o 3,2 kb, 6,7 kb, 2,0 kb nebo 6,4 kb s obsahem genu PR-la. Aby bylo možno ověřit tento předpoklad, byly rozštěpeny tři mikrogramy chromosomální DNA tabáku příslušnými enzymy a získaný materiál byl podroben elektroforéze na 0,7% agarosovém gelu. Získaná DNA byla přenesena na nylonovou membránu a uvedena do styku se značeným fragmentem po působení restričních enzymů XhoI-BstEII z genu PR-la jako sondou. Pro kontrolu byla rozštěpena také DNA plasmidu pBS-PR1013Cla a byla podrobena elektroforéze na totéž gelu. Jak bylo předpokládáno, materiály, rozštěpené působením enzymu EcoRI, HindIII, XhoI + BglII a HindIII + PstI daly

vznik pásům s očekávanou molekulovou hmotností, které se pohybovaly současně s kontrolními pásy. Je tedy zřejmé, že DNA, která je obsažena v klonu tobchrPR1013 představuje část DNA genu tabáku.

P ř í k l a d 13

Příprava pBS-PR1013Eco

A. Plasmid pBS-PR1013Ecc se konstruuje subklonováním fragmentu o 3,6 kb po působení enzymu EcoRI s obsahem genu PR-1a z tobchrPR1013 podle příkladu 9 do jediného místa působení enzymu EccRI v plasmidu Bluescript. Plasmid Bluescript (číslo katalogu 21203) je možno získat od Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California. Strukturu pBS-PR1013Eco bylo možno potvrdit jak mapováním míst působení restrikčních enzymů, tak analýzou řetězce DNA. Konstrukce tohoto plasmidu je znázorněno na obr. 3.

B. Je možno postupovat také tak, že se plasmid pBS-PR1013Cla rozštěpí enzymem EccRI a fragment o 3,6 kb, který obsahuje gen PR-1a se izoluje.

Plasmid Bluescript se rozštěpí působením enzymu EcoRI a pak se smísí a naváže s předběžně izolovaným fragmentem o 3,6 kb po štěpení EcoRI. Tato konstrukce plasmidu je znázorněna na obr. 4.

P ř í k l a d 14

Příprava pBS-PR1013EcoΔPst

Plasmid pBS-PR1013Eco se rozštěpí enzymem PstI a fragmenty DNA se dělí na 2,5 % agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Velký fragment, který obsahuje vektor Bluescript a fragment o 3,0 kb z DNA tabáku se přesně vyříznou a materiál se zahřeje na teplotu 65 °C k roztavení agarosy. Pak se 2,ul tohoto materiálu přidají k 15,ul vody a DNA se váže v agarose způsobem podle příkladu 1. Po inkubaci přes noc se agarosa s obsahem DNA roztaví zahřátím na 10 minut na teplotu 65 °C a pak se transformuje z agarosy způsobem, popsaným v příkladu 2. Část bakteriální kultury z každé ze šesti pozitivních konstrukcí se naočkuje do 5 ml prostředí LB podle svrchu popsané Millerovy publikace s obsahem 100,ug/ml ampicilinu a kultura se inkubuje přes noc při teplotě 37 °C. Pak se buňky oddělí odstředěním v klinické odstředivce při plné rychlosti po dobu 10 minut. Superna-

tant se oddělí a buňky se pak znovu uvedou do suspenze ve 100, μ l 50 mM glukosy, 25 mM tris-pufu o pH 7,5 a 10 mM EDTA a suspenze se pak přenesse do Eppendorfovy zkumavky pro odstřeďování s objemem 1,5 ml. K suspenzi se přidá 25, μ l čerstvě připraveného roztoku lysozymu o koncentraci 10 mg/ml a suspenze se nechá stát na ledu 10 minut. Pak se k suspenzi přidá 200, μ l 0,2M hydroxidu sodného s 1 % dodecylsírany sodného a suspenze se promíchá a nechá se stát na ledu ještě 2 minuty. Pak se přidá 200, μ l 2M octanu sodného o pH 4,8 a roztok se nechá stát na ledu 15 minut. Výsledný roztok se pak odstředí plnou rychlostí celkem 10 minut v Eppendorfově odstředivce. Supernatant se oddělí do čerstvé zkumavky pro odstředivky a extrahuje se 400, μ g směsí fenolu a chloroformu v poměru 1 : 1. Vodná fáze se oddělí do čerstvé zkumavky a extrahuje se 400, μ l chloroformu. Vodná fáze z této extrakce se oddělí do čerstvé zkumavky a DNA se vysráží přidáním dvou objemů ethanolu a pak se nechá stát 30 minut při teplotě -20°C . Vysrážená DNA se oddělí odstředěním v Eppendorfově mikroadstředivce plnou rychlostí 15 minut. Ethanol se odstraní a usazenina se promyje 80% ethanolem. Ethanol se znovu odstraní a usazenina se nechá schnout na vzduchu. Pak se DNA znovu uvede do suspenze ve 100, μ l pufu TE. Konstrukce se ověří rozštěpením působením enzymu PstI.

Původní plasmid pBS-PR1013Eco poskytuje pás pro fragment o 6 kb a pás o přibližně 650 kb, přičemž pás pro menší fragment v nové konstrukci chybí. Jeden z těchto plasmidů byl identifikován jako plasmid pBS-PR1013Eco Δ Pst. Struktura tohoto subklonu byla ověřena analýzou řetězce. Konstrukce tohoto plasmidu je znázorněna na obr. 5.

P ř í k l a d 15

Příprava pBS-PR1013Eco Δ Pst Δ Xho

Byla stanovena předběžná mapa působení restrikčních enzymů z plasmidu pBS-PR1013Eco. Místo působení enzymu XhoI je umístěno přibližně 1200 bp směrem vzhůru od místa působení PstI. Plasmid pBS-PR1013Eco Δ Pst se rozštěpí enzymem XhoI a fragmenty se dělí na 0,9% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Vizualizovány byly dva fragmenty s rozměry 3,9 kb a 1,7 kb. Pás, který obsahoval fragment o 3,9 kb byl pečlivě vyříznut z gelu a vázán v agarose svrchu uvedeným způsobem. Po roztavení agarosy byla užita DNA k transformaci kmene E. coli HB101- Získané buňky byly nanесeny na plotny LB-amp a inkubovány svrchu uvedeným

způsobem. Jedna z pozitivních klonů byla naočkována na prostředí LB-amp a DNA byla izolována v podstatě svrchu uvedeným způsobem. Struktura tohoto nového subklonu pBS-PR1013EcoΔPstΔXho byla ověřena analýzou pomocí restrikčních enzymů a stanovením řetězce DNA. Konstrukce tohoto plasmidu je znázorněna na obr. 6.

P ř í k l a d 16

Příprava pCIB270

Plasmid pB1101.3 (číslo katalogu 6024.1) je možno získat od Clonotech Labs, Palo Alto, California. Tento plasmid se nejprve rozštěpí enzymem BamHI a pak enzymem SalI. Plasmid pBS-PR1013EcoΔPstΔXho se rozštěpí působením enzymu PstI. Pak se připraví adaptor PstI/BamHI s řetězcem

5'-GGGATCCCTGCA-3'

způsobem podle příkladu 4 a tento adaptor se ^aneváže na svrchu uvedený plasmid po jeho rozštěpení enzymem PstI. Výsledný materiál se nejprve rozštěpí enzymem BamHI a pak enzymem XhoI. Fragment BamHI/XhoI se izoluje, načež

se smísí a váže na rozštěpený plasmid pBI101.3 a materiál se užije k transformaci. Izoluje se pozitivní klon pCIB270, jehož struktura se ověří působením restrikčních enzymů a analýzou řetězce DNA. Příprava tohoto plasmidu je znázorněna na obr. 7.

P ř í k l a d 17

Příprava M13mpl8- nebo M13mpl9-PR1013EcoΔPstΔXho

Plasmid pBS-PR1013EcoΔPstΔXho se rozštěpí enzymy PstI a Asp718. Fragment Asp718/PstI o velikosti 1,1 kb se izoluje po elektroforeze na 1% TAE-agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Replikativní forma (RF) fágu E. coli, M13mpl8 nebo M13mpl9 se připraví způsobem podle publikace Messing J., Meth. Enzymol. 101, 20 (1983). Tyto vektory je také možno přímo získat od Bethesda Research Labs., Gaithersburg, Maryland. Kterýkoliv z těchto vektorů se rozštěpí nejprve enzymem Asp718 a pak enzymem PstI. Po odstranění polyvazné části elektroforézou na 0,7% TAE agarose s nízkou teplotou tuhnutí se výsledný vektor RF mísí a váže v agarose na fragment o velikosti 1,1 kb, připravený svrchu uvedeným způsobem. Pak se získaná DNA užije

k transformaci, pozitivní tlaky se izolují a jejich struktura se ověří analýzou RF DNA. Konstrukce M13mpl8- a M13mpl9-PR1013Eco Δ Pst A Xho je znázorněna na obr. 8.

P ř í k l a d 18

Příprava M13mpl8- nebo M13mpl9-PR1013Eco Δ Pst A Xho .
. Nco a pCIB 268

DNA M13mpl8-PR1013Eco Δ Pst A Xho s jednoduchým řetězcem se izoluje podle svrchu uvedené Nessingovy publikace. Oligonukleotidový primer o 18 bp s řetězcem

5'-AATCCCATGGCTATAGGA-3'

se syntetizuje svrchu uvedeným způsobem. Primer se fosforyluje T4 polynukleotidkynázou způsobem, popsáním na str. 125 svrchu uvedené publikace Maniatis R. a dalších při použití neznačeného ATP. Po inkubaci 60 minut při teplotě 37 °C se reakční směs zahřeje na 15 minut na teplotu 68 °C a pak se uloží do ledu. Tento primer a další primer M13-40 (New England Biolabs 1212) se spojí s DNA M13mp-18-PR1013Eco Δ Pst A Xho s jednoduchým

řetězcem po smísení v molárním poměru 1 : 1 : 1, po zahřívání 10 minut na teplotu 68 °C se směs pomalu zchladí. Pak se směs po ukončené vazbě uloží do ledu a přidá se 10x pufr pro prodloužení řetězce (20 mM tris-pufu o pH 7,5, 6 mM chloridu hořečnatého, 1 mM DTT, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP a 1 mM dTTP). Pak se přidá 10 jednotek velkého fragmentu DNA polymerázy I (Klenowův fragment, New England Biolabs 210) a 0,1 jednotky T4 DNA lygázy (NEB 202) a reakční směs se nechá probíhat 14 hodin při teplotě 15 °C. Po této době se přidá další podíl uvedených enzymů a reakce se nechá probíhat ještě 2 hodiny při teplotě 25 °C, načež se směs užije k transformaci kmene E. coli JM101. Diagram tohoto postupu je znázorněn na obr. 9.

Aby bylo možno identifikovat mutovaný fág, byly plaky přeneseny na filtr Gene Screen Plus (DuPont) a zpracovávány podle doporučení výrobce. Filtry byly předem hybridizovány 4 hodiny a pak hybridizovány přes noc při teplotě 42 °C v roztoku, dodaném výrobcem a obsahujícím 0,9 M chloridu sodného. Pak se filtry postupně promývají chloridem sodným o koncentraci 0,9 M a postup se sleduje autoradiograficky, přičemž teplota se v každém stupni zvýší o 5 °C. Fágy, identifikované hybridizací tak, že v nich byly objeveny mutace se dále sledují zjištěním řetězce k průkazu změny.

Replikativní forma jednoho z těchto fágů (M13mpl8-PR1013EcoΔ Pst Δ Xho.Nco) se izoluje a rozštěpí enzymy PstI a BstEII za vzniku fragmentu o 394 bp, který se užije k náhradě odpovídajícího nemutovaného fragmentu o velikosti 394 bp v plasmidu pBS-PR1013EcoΔ Pst Δ Xho, znázorěném na obr. 10. Tímto způsobem se získá plasmid pCIB268, který obsahuje místo působení enzymu NcoI v poloze 930, za tímto místem následuje kódový řetězec pro gen PR-1a o délce 217 bp. Struktura uvedeného plasmidu byla potvrzena analýzou jeho řetězce.

P ř í k l a d 19

Příprava chimérických genů s obsahem GUS a s různou délkou sledu promotoru PR

A. Konstrukce plasmidu pCIB269

Fragment o 930 bp se izoluje o elektroforéze plasmidu pCIB268 enzymy XhoI a NcoI na 1,0% agarosovém TAE gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Tento fragment se pak naváže do plasmidu pBS-GUS1.2 (příklad 19 B), který byl rozštěpen týmiž enzymy XhoI a NcoI. Transformanty

se izolují a analyzují zjištěním míst působení restričních enzymů a analýzou řetězce DNA. Zvolí se jeden pozitivní plasmid, kterému byl dán název pCIB269. Konstrukce tohoto plasmidu je znázorněna na obr. 11.

B. Konstrukce pBS-GUS1.2

Plasmid pBS-GUS1.2 se zkonstruuje tak, že se naváže fragment o 391 bp z plasmidu pRAJ265 po jeho rozštěpení enzymy Sall/SnaBI (Jefferson R.A. a další, EMBO J. 6, 3091 - 3907, (1987) a GUS User Manual, Clontech Labs., Palo Alto, Ca.), dále fragment o 1707 bp po rozštěpení plasmidu pBI221 podle téže publikace a pBS, rozštěpený působením enzymu Sall a EcoRI, jak je znázorněno na obr. 12. Transformanty se izolují a analyzují stanovením míst působení restričních enzymů a analýzou řetězce DNA. Jeden z ověřených klonů byl nazván pBS-GUS1.2.

C. Konstrukce pCIB200

Nejprve se vytvoří TJS75kan rozštěpením pTJS75 (Schmidhauser a Helinski, J. Bacteriol. 164,

446 - 455 (1985)) působením enzymu NarI k vyjmutí tetra-cyklinového genu, následuje včlenění fragmentu AccI z pUC4K (Messing J. a Vierra J., Gene 19, 259 - 268 (1982)), který nese gen NptI. Plasmid pCIB200 se pak vytvoří navázáním vazných řetězců XhoI na fragment EcoRV z plasmidu pCIB7, (obsahující levou a pravou okrajovou část T-DNA, chimérní gen nos/nptII, schopný selekce v rostlině a řetězec pUC, schopný vazby, Rotstein S.J. a další, Gene 53, 153 - 161 (1987)), načež se klonuje fragment po štěpení XhoI v TJS75Kan po rozštěpení enzymem SalI.

D. Konstrukce pCIB271

Plasmid pCIB269 z příkladu 19 A se rozštěpí působením enzymu XhoI a EcoRI a fragment o 3023 bp, obsahující promotor PR-1a, vázaný na gen GUS se zakončením nos 3' se izoluje elektroforézou na 1,0% TAE agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Tento fragment se pak naváže na vektor pCIB200, vhodný pro širokou skupinu hostitelů po jeho rozštěpení enzymy SalI a EcoRI. Transformanty se izolují a analyzují se působením restričních enzymů. Jeden z ověřených klonů byl nazván pCIB271. Konstrukce tohoto klonu je znázorněna na obr. 13.

E. Konstrukce pCIB272

Plasmid pCIB268 z příkladu 18 se rozštěpí enzymy AluI a NcoI a fragment o velikosti 833 bp se izoluje elektroforézou na 0,7% TAE agarosovém gelu. Tento fragment se naváže na gen pro β -glukuronidázu se zakončením nos 3' v plasmidu pBS-GUS1.2 z příkladu 19 B. Promotor a gen GUS se pak vyjmou z plasmidu, nazvaného pCIB282 jako fragment po rozštěpení enzymy Asp718I/BamHI a uloží se do plasmidu pCIB200, rozštěpeného enzymy Asp718I a BamHI před transformací E.coli, kmene DH5 α . Transformanty se izolují a analyzují se stanovením míst působení restričních enzymů. Jeden z ověřených klonů byl nazván pCIB272.

F. Konstrukce pCIB273

Plasmid pCIB268 se rozštěpí enzymy HaeIII a NcoI a fragment o velikosti 603 bp se izoluje elektroforézou na 0,7% TAE agarosovém gelu. Tento fragment se uloží před gen pro β -glukuronidázu se zakončením nos 3' v plasmidu pBS-GUS1.2. Promotor a gen GUS se pak vyjmou z uvedeného plasmidu, nazvaného pCIB283 jako fragment po rozštěpení enzymy Asp718I/BamHI a uloží se

do plasmidu pCIB200, rozštěpeného enzymy Asp718I a BamHI před transformací E. coli kmene DH5 α . Transformanty se izolují a analyzují restriční analýzou. Jeden z ověřených klonů byl nazván pCIB273.

P ř í k l a d 20

Příprava chimérního genu ve vektoru hygromycinu

Plasmid pCIB269 se rozštěpí působením enzymu XhoI a EcoRI a fragment o velikosti 3023 bp, nesoucí promotor PR-1a, vázaný na gen GUS se zakončením nos 3' se izoluje elektroforézou na 1,0% TAE agarosovém gelu. Tento fragment se pak převede na fragment XhoI/SalI navázáním adaptoru EcoRI/SalI s řetězcem

5'-AATTCGTCGACG-3' .

Fragment XhoI/SalI se naváže na plasmid pCIB712 po jeho rozštěpení enzymem SalI (Rothstein S. J. a další, svrchu) za vzniku plasmidu pCIB219, tak jak je znázorněno na obr. 14.

P ř í k l a d 21

Příprava pCIB200/PR1-BT

A. Vazba s pCIB200

Plasmid p-CIB1004, který bude dále uveden, se rozštěpí působením enzymu SphI, extrahuje se fenolem, materiál se vysráží ethanolem a znovu se uvede do suspenze. Syntetizuje se oligonukleotid s řetězcem



a tento řetězec se čistí, zpracuje působením kinázy a pak se naváže na plasmid pCIB1004, rozštěpený enzymem SphI. Po vazbě se ligáza inaktivuje a získaná DNA se rozštěpí enzymem KpnI. Materiál se pak podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu. Plasmid pCIB200, popsaný v příkladu 19 C se rozštěpí působením enzymu KpnI a pak se zpracovává působením alkalické fosfatázy z telecího střeva a materiál se znovu podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás, který obsahuje vektor pCIB200 a pás, který obsahuje spojení sousedícího řetězce 5'-PR-1 a BT se smísí s DNA se naváže za vzniku pCIB200/PR1-BT.

B. Příprava pCIB1004

Plasmid pCIB10/35Bt(607) se rozštěpí enzymy NcoI a BamHI a podrobí se elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB269, popsaný v příkladu 19 A se rozštěpí působením enzymů NcoI a XhoI a rovněž se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB710, popsaný ve svrchu uvedené publikaci Rothsteina S. J. a dalších se rozštěpí enzymy SalI a BamHI a rovněž se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás vektoru, rozštěpeného enzymy SalI a BamHI, obsahující 3'-zakončení promotoru CaMV 35S, klonované v pUC19, pás s obsahem genu BT a pás s obsahem 5'-oblasti PR-1 se vyříznou, smísí a naváží za vzniku plasmidu pCIB1004.

C. Příprava pCIB10/35Bt(607)

Plasmid pCIB10/35Bt(607) s vypuštěným genem pro protoxin, obsahující kódový řetězec pro přibližně 607 aminokyselin se připraví z plasmidu pCIB10/35Sbt, který obsahuje gen pro protoxin endotoxinu *Bacillus thuringiensis*. Kmen *E. coli* MC1061 s obsahem

uvedeného plasmidu byl uložen do veřejné sbírky kultur American Type Culture Collection, ATCC č. 67329, 27. února 1987. Gen s odstraněným protoxinem se získá tak, že se do genu BT za nukleotidem 1976 uloží místo působení enzymu BamHI (GGATCC). To je možno provést klonováním fragmentu BamHI s obsahem řetězce protoxinu z plasmidu pCIB10/35Sbt v mpl8 s použitím standardního postupu tvorby mutace s použitím oligonukleotidu. Po vzniku mutace se připraví z klonu M13 replikativní forma DNA s dvojitým řetězcem a ta se pak rozštěpí enzymem BamHI. Fragment o velikosti přibližně 1,9 kb s obsahem odstraněného genu pro protoxin se včlení do plasmidu pCIB10/710 po rozštěpení enzymem BamHI. Výsledný plasmid se podrobí selekci na kanamycin. Podrobný popis tohoto postupu je uveden v US patentové přihlášce č. 122 109, podané 18. listopadu 1987.

P ř í k l a d 22

Příprava pCIB1233 (pCIB200/PR1-AHAS)

A. Vazba s pCIB200

Plasmid pCIB200 se rozštěpí enzymy KpnI a XbaI a získaný materiál se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB1216 se rozštěpí působením týchž enzymů a materiál se rovněž podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás o přibližně 4,3 kb, který obsahuje 5'-část řetězce PR-1 spojenou s kódovým řetězcem AHAS a pás, obsahující vektor pCIB200 se vyříznou, smísí a DNA se podrobí vazbě za vzniku pCIB1233.

B. Příprava pCIB1216

Plasmid pCIB269, popsaný v příkladu 19 A se rozštěpí enzymy XbaI a NcoI a pak se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB1207, který bude dále uveden, se rozštěpí působením týchž enzymů a získaný materiál se rovněž podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás, který obsahuje vektor Bluescript s 5'-oblastí PR-1 a pás o velikosti 3,3 kb s obsahem kódového řetězce AHAS se vyříznou, smísí a DNA se podrobí vazbě, čímž se získá výsledný plasmid pCIB1216.

C. Příprava plasmidu pCIB1207 s obsahem genu Arabidopsis
AHAS

Z pět týdnů starých *Arabidopsis thaliana*, ecotyp Columbia se izoluje celková DNA. 250 mg této DNA se štěpí 4 hodiny působením 4000 jednotek restrikčního enzymu XbaI. Získaný materiál se pak podrobí frakcionaci elektroforézou na 0,8% agarosovém gelu. Fragmenty DNA v rozmezí velikostí 6,5 kb a 4,36 kb, dělení je založeno na DNA, štěpené HindIII s označením velikosti) se izolují z gelu při použití DEAE membrány NA-45 (Schleicher a Schuell, Keene, NH, USA) podle doporučení výrobce. Lambda onG (long C) po působení fosfatázy a po štěpení enzymem XbaI je možno získat ze Stratagene Cloning Systems (La Jolla, CA, USA). 0,1 µg včleněné DNA z *Arabidopsis* XbaI se naváže na větev longC v množství 1,0 µg podle doporučení výrobce. 2,5 µl reakční směsi se uloží do fágu lambda při použití Gigapack Plus kit (Stratagene Cloning Systems) podle doporučení výrobce. Účinnost získaného materiálu se titruje na kmeni *E. coli* VCS257 (Stratagene Cloning Systems).

50 µg DNA z plasmidu pEl6/8-c4 (J. Polaina, Carlsberg Res. Comm. 49, 577 - 584) se rozštěpí působením enzymu EcoRI a získaný materiál se rozštěpí na 0,8% agarosovém gelu. Fragment o 2 kb po

štěpení enzymem EcoRI, který obsahuje kódový řetězec pro gen AHAS z kvasinek se z gelu izoluje při použití DEAE membrány NA45 podle doporučení výrobce. Pak se syntetizují radioaktivně značené sondy, odpovídající fragmentu o 2 kb hybridizační reakcí při použití Prime Time kit (International Biotechnologies Inc., New Haven, CT, USA) podle doporučení výrobce.

250 000 rekombinantních fágů se nanese na VCS257. Duplikáty plaků fágů z této membrány se získají použitím membrán Colony/Plaque Screen (NEN Research Products, DuPont, Boston, MA, USA) podle doporučení výrobce. Membrány se předem hybridizují v LS hybridizačním pufru, pak se přenesou do 150 ml čerstvého LS hybridizačního pufru s obsahem 0,2 µg sondy pro gen AHAS z kvasinek, značené radioaktivním fosforem, připravené svrchu uvedeným způsobem. Pak se membrány inkubují 16 hodin při teplotě 42 °C za opatrného protřepávání, načež se dvakrát promyjí vždy 15 minut při použití 2xSSC, pak se promyjí při teplotě 42 °C ještě třikrát při použití LS promývacího pufru (25% formamid, 5xSSC a 1 % SDS), každé promytí trvá 2 hodiny, načež se membrány ještě dvakrát opláchnou v oplachovacím pufru (0,1xSSC a 0,1 % SDS) každé oplachování trvá 30 minut. Membrány se pak upevní a podrobí fluorografii na Cronex Lighte-

ning Plus Screens (Du Pont, Wilmington, DE, USA) a filmu XAR-5 (Kodak). Plaky z těch oblastí desky, kde bylo dosaženo pozitivních signálů na obou membránách se vyjmou a znovu se nanесou při nižší hustotě 300 plaků na 150 mm desky a postup se opakuje tak dlouho, až se izolují jednotlivé hybridizační plaky.

Preparace DNA fágu z takto čištěného fágu se provádí následujícím způsobem při použití Lambda-Sorb Phage Adsorbent kit (Promega, Madison, WI, USA). DNA fágu se rozštěpí restriční enzymem XbaI a fragment o velikosti 5,8 kb se klonuje v místě působení enzymu XbaI plasmidu pBS(-) (Stratagene Cloning Systems). Identita klonovaného fragmentu s fragmentem XbaI, který obsahuje gen AHAS z Arabidopsis se ověří srovnáním mapy míst působení restričních enzymů tohoto materiálu s údaji, které byly publikovány pro uvedený gen v publikaci Haughn a další, Mol. Gen. Genet. 211, 266 (1988) a Mazur a další, Plant Physiol. 85, 1110 (1987). Získaný plasmid byl označen pCIB1207.

P ř í k l a d 23

Příprava pCIB1232 (pCIB200/PR1-AHAS-SuR)

A. Vazba s pCIB200

Plasmid pCIB200 z příkladu 19 C se rozštěpí enzymy KpnI a XbaI a materiál se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB1230 se rozštěpí enzymy KpnI a XbaI a materiál se rovněž rozdělí elektroforézou na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás o přibližně 4,3 kb, který obsahuje 5'-oblast PR-1, spojenou s kódovým řetězcem AHAS-SuR a pás, který obsahuje vektor pCIB200 se vyříznou, smísí a DNA se naváže za vzniku plasmidu pCIB1232.

B. Příprava pCIB1230

Plasmid pCIB1208, který bude dále uveden, se rozštěpí enzymy XbaI a NcoI a fragmenty se dělí elektroforézou na 0,8% TAE agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB269, uvedený v příkladu 19 A se rozštěpí týmiž enzymy a materiál se rovněž rozdělí na 0,8% TAE agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Fragment plasmidu pCIB269, který obsahuje vektor Bluescript a promotor PR-1 a fragment o 3,3 kb s obsahem mutovaného genu AHAS (identifikovaný skříženou

homologií a analýzou restričního fragmentu s .genem podle publikace Mazur a další, Plant Physiol. 85, 1110 - 1117 (1987) se vyříznou, gel se roztaví a fragmenty se naváží za vzniku klonu, který byl označen jako pCIB1230.

C. Příprava pCIB1208

Sestava DNA genomu se zkonstruuje obdobným způsobem jako v příkladu 22 při použití DNA, izolované z rostlin Arabidopsis, podrobených selekci na odolnost proti herbicidu sulfonylmočovině způsobem podle publikace Haughn a Somerville, Mol. Gen. Genet. 204, 430 - 434 (1986). Plaky s obsahem genů, které jsou kódem pro syntetázu acetohydroxykyselinu (AHAS) se identifikují zkříženou hybridizací se sondou genu syntetázy acetohydroxykyseliny z kvasínek, která byla uvedena v příkladu 22 C. Rekombinantní DNA se pak podrobí subklonování v plasmidu Bluescript (Stratagene), čímž se získá klon, který byl označen jako pCIB1208. Tento plasmid obsahuje gen, který je kódem pro mutovanou syntetázu acetohydroxykyselinu, která je odolná proti inhibici působením herbicidů typu sulfonylmočoviny.

P ř í k l a d 24

Izolace klonu genomu, který je kódem pro zásaditou
formu β -1,3-glukanázy (Glukan Endo-1,3- β -glukosidázy)
z *Nicotiana Tabacum*

Vysokomolekulární DNA se připraví z listů *Nicotiana tabacum* cv. Havana 425 postupem CETAB, uvedeným v publikaci Murray a Thompson, *Nucleic Acid. Res.* 8, 4321 (1980). 100 μ g DNA se úplně rozštěpí enzymem *SacI*. Pak se materiál dělí elektroforézou na 0,8% agarosovém gelu. Oblast gelu, která odpovídá molekulové hmotnosti od 3 do 7 kb se rozřeže na šest proužků stejného rozměru, načež se DNA z těchto proužků izoluje elektroelucí a vysráží se v oddělených frakcích. Pak se DNA znovu uvede do suspenze a podíl z každé frakce se znovu dělí elektroforézou na agarosovém gelu a analyzuje se metodou Southern blot. Frakce, které obsahují DNA, která hybriduje se sondou cDNA pro β -1,3-glukanázu (Shinshi H. a další, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5541 - 5545 (1988) se slíjí a použijí k získání sestav fragmentu.

Vektor lambda *OngC* pro klonování (Stratagene Corp.) se rozštěpí enzymem *SacI*. 1 μ g této DNA se smísí s 0,1 μ g DNA tabáku, rozštěpené tímtož enzymem, načež se provádí vazba působením T4 DNA ligázy

podle doporučení výrobce. Pak se navázaná DNA uloží do částic fágu při použití způsobu in vitro podle doporučení výrobce (Stratagene). Fágy se nanesou podle doporučení výrobce na plotnu. Přibližně 75 000 plaků se zkoumá při použití sondy cDNA, značené 32-P pro 8-1,3-glukanázy. Bylo identifikováno 11 pozitivních plaků. Tyto plaky byly čištěny postupným nanášením na plotnu a dalším průzkumem.

Z čištěných klonů se izoluje DNA a jednotlivé klony se analyzují rozštěpením restriktivního enzymu HindIII, EcoRI a SacI. Klony jsou dvou typů, jde o klon 39.1 a o klon 39.3. V klonu 39.1 je včleněn fragment o 4,5 kb, v klonu 39.3 je včleněn fragment o 4,7 kb. Tyto klony byly subklonovány v plasmidu Bluescript po jeho rozštěpení enzymem SacI a byly izolovány subklony pBSGluc39.1 (SacI fragment, odvozený od klonu lambda 39.1) a pBSGluc39.3 (SacI fragment, odvozený od klonu lambda 39.3). Řetězec DNA ve fragmentech SacI obsažený v subklonech pBSGluc39.1 a pBSGluc39.3 byl stanoven zjištěním řetězce DNA, a byl svrchu uveden jako řetězec 5 a řetězec 6. Byl také zjištěn kódový řetězec a bylo prokázáno, že v blízkosti 5'-zakočení tohoto kódového řetězce je uložen velký cizorodý řetězec.

P ř í k l a d 25

Identifikace místa, v němž je uložen počátek transkripce
genu pro β -1,3-glukanázu

A. Mapování prodloužení primeru

Syntetizuje se syntetický primer DNA, který je komplementární k bazím 2399 až 2416 a tento primer se užije k pokusům s prodloužením primeru, tak jak byly popsány v příkladu 5. RNA pro tyto pokusy se izoluje z rostlinek tabáku, infikovaných *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*. Produkty prodloužení primeru se analyzují proti standardům pro molekulovou hmotnost, v nichž je použito značeného primeru při sledování řetězce dideoxy DNA, přičemž subklon pBSGluc39.1 je užit jako templát. Produkty prodloužení se identifikují po elektroforéze na gelu a po autoradiografii podle příkladu 5 a je možno prokázat, že odpovídají polohám 1432, 1446 a 1447 řetězce pro β -1,3-glukanázu 39.1, řetězec 5. Protože se mezi polohami 1554 a 2345 plasmidu pBSGluc 39.1 nachází velký intron, nemůže analýza molekulové hmotnosti odrážet správnou molekulovou hmotnost produktů prodloužení. Z tohoto důvodu byl proveden další pokus s mapováním prodloužení primeru, který je komplementární

k polohám 1530 až 1547. Při použití tohoto primeru bylo možno mapovat 5'-zakońčení mRNA glukánázy ke zbytkům A v polohách 1434, 1448 a 1449.

B. Mapování S1 nukleázou

Byl syntetizován oligonukleotid, komplementární v polohách 1415 až 1504 pro použití jako sonda při mapování pomocí S1-nukleázou. Oligonukleotid byl zpracován působením kinázy na 5'-zakońčení při použití ^{32}P -ATP a T4 polynukleotidkinázy podle doporučení výrobce. Po extrakci fenolem a vysrážení ethynolem byl značený oligonukleotid znovu uveden do suspenze ve formamidovém pufru pro hybridizaci (Příklad 6) v koncentraci přibližně 2 nM. RNA, která byla při těchto pokusech použita byla izolována z tabáku, infikovaného *Phytophthora parasitica* jako v předchozím příkladu. Mapování pomocí S1 nukleázy se na této RNA provádí při použití značeného oligonukleotidu stejně jako v Příkladu 6. Po elektroforéze na gelu bylo možné prokázat tři pásy, které odpovídají polohám 1434, 1448 a 1449 v řetězci DNA plasmidu pBSGluc39.1.

C. Stanovení místa počátku transkripce

Jak metoda s prodloužením primeru, tak mapování při použití S1-nukleázy kladou 5'-zakońčení mRNA

do polohy 1434, 1448 a 1449. Z tohoto důvodu odpovídají tato místa, v nichž se ve všech případech nachází adeninový zbytek, počátku transkripce genu pro β -1,3-glukanázu.

P ř í k l a d 26

Příprava plasmidu pBSGluc39.1/GUS

Oligonukleotid s řetězcem

A) 5'-GTITATGTGAGGTAGCCATGGTGGGAAGACTTGTGGG-3'

B) 5'-GATCGCGGTACCGAGCTCCTCTAGGGGGCCAAGG-3'

se syntetizuje, čistí a použije v polymerázou katalyzované reakci (PCR) podle doporučení výrobce (Perkin Elmer Cetus, DNA thermal cycler; Perkin Elmer Cetus, GeneAmp Reagent Kit) k amplifikaci fragmentu o 1494 bp z DNA z plasmidu pBSGluc39.1. Oligonukleotidy jsou určeny k přidání místa působení enzymu KpnI bezprostředně vedle místa působení enzymu SacI v páru bazí 1 v řetězci glukanázy 39.1 za vzniku nového místa působení enzymu NcoI v páru bazí 1462. DNA, odvozená z PCR amplifikací se extrahuje směsí fenolu a chloroformu a vysráží se ethanolem. Pak se DNA uvede znovu do suspenze a rozštěpí se restrikcními en-

zymy NcoI a KpnI a pak se rozdělí elektroforézou na agarózovém gelu s koncentrací 0,8 % a nízkou teplotou tuhnutí. Pás o 1462 bp se vyřízne a užije pro následující vazbu. Plasmid pBS-GUS1,2 (Příklad 19B) se rozštěpí působením enzymů NcoI a KpnI a získaný materiál se podrobí elektroforéze na 0,8% agarózovém gelu a pás s obsahem vektoru se vyřízne. Pás, který obsahuje vektor pBS-GUS1.2 a pás o 1462 bp z reakce PCR se naváží a pak se užijí k transformaci E. coli. Positivní kolonie se izolují a podrobí se selekci na ty kolonie, které obsahují včleněný fragment o 1462 bp. Plasmidy, které tento fragment obsahují jsou hledanými klony plasmidu pBSGluc39.1/GUS, avšak vzhledem k tomu, že častost mutace je poměrně veliká, a to přibližně 1/1000 bp, je nutno podrobit stanovení řetězce několik klonů celým fragmentem o 1462 bp. Jeden z klonů, které měly požadované složení řetězce byl vybrán jako klon pBSGluc39.1/GUS.

P ř í k l a d 27

Příprava pBSGluc39.3/GUS

Oligonukleotidy s řetězcem

A) 5'-GTTTATCTGAGGTAGCCAATGGTGAGAAGACTTGTGGGA-3'

B) 5'-GATCGCGGTACCGAGCTCCCTTGGGGGGCAAG-3'

se syntetizují a použijí v PCR reakci k amplifikaci fragmentu o 1677 bp z plasmidu pBSGluc39.3. Oligonukleotidy jsou určeny k zavedení nového místa působení enzymu KpnI bezprostředně v sousedství místa působení enzymu SacI v poloze 1 řetězce pro glukonázu 39.1 a nového místa působení enzymu NcoI v poloze 1646. DNA z amplifikace PCR se extrahuje směsí fenolu a chloroformu, vysráží se ethanolem, znovu se uvede do suspenze, rozštěpí se enzymy NcoI a KpnI a pak se takto získaný materiál podrobí elektroforéze na 0,8% agarozovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás pro 1646 bp se vyřízně a užije pro následující vazbu. Plasmid pBS-GUS1.2 se rozštěpí enzymy NcoI a KpnI a takto získaný materiál se podrobí elektroforéze na 0,8% agarozovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás s obsahem vektoru se vyřízně, smísí se s pásem pro 1646 bp z reakce PCR a naváže se za vzniku plasmidu pBSGluc39.3/GUS. Stejně jako svrchu se izoluje několik výsledných plasmidů s následným určením jejich řetězce a jeden z těchto plasmidů s očekávaným řetězcem se pak označí jako výsledný plasmid pBSGluc39.3/GUS.

P ř í k l a d 28

Příprava pCIB200/Gluc39.1-GUS a pCIB200/Gluc39.3-GUS

A. Plasmid pCIB200 z příkladu 19C se rozštěpí enzymy KpnI a XbaI a získaný materiál se podrobí elektroforéze na 0,8% agarozovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pak se plasmid pBSGluc39.1/GUS z Příkladu 26 podrobí štěpení působením enzymů KpnI a XbaI a fragmenty se robněž oddělí elektroforézou na 0,8% agarozovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pásky, které obsahují vektor pCIB 200 a pás KpnI-XbaI s obsahem 5'-část genu pro 39.1 glukonázu, spojenou s genem GUS se vyříznou a DNA se naváže za vzniku plasmidu pCIB200/Gluc39.1-GUS.

B. Obdobným způsobem se plasmid pBSGluc 39.3/GUS z Příkladu 27 rozštěpí a naváže na rozštěpený plasmid pCIB200 za vzniku plasmidu pCIB200/Gluc39.3-GUS.

P ř í k l a d 29

Příprava pCIB200/Gluc39.1-BT a pCIB200/Gluc39.3-BT

A. pCIB200/Gluc39.1-BT

Plasmid pBSGluc39.1/GUS se rozštěpí enzymy KpnI a NcoI a pak se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB1004, popsaný v příkladu 21 B se rozštěpí enzymy KpnI a NcoI a rovněž se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB200, popsaný v příkladu 19 C se rozštěpí působením enzymu KpnI, defosforyluje se při použití alkalické fosfatázy z telecího střeva a pak se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás, který obsahuje vektor pCIB200, pás, který obsahuje 5'-část genu pro glutanázu a pás, obsahující gen BT se vyříznou, smísí a vzájemně naváží, čímž se získá plasmid pCIB200/Gluc39.1-BT.

B. pCIB200/Gluc39.3-BT

Obdobným způsobem se rozštěpí plasmid pBSGluc.39.3/GUS a pak se získaný materiál naváže s materiálem z rozštěpeného plasmidu pCIB1004 a s materiálem z rozštěpeného plasmidu pCIB200 za vzniku výsledného plasmidu pCIB200/Gluc39-3-BT.

P ř í k l a d 30

Příprava pCIB200/Gluc39.1-AHAS a pCIB200/Gluc39.3-AHAS

A. Vazba s pCIB200

Plasmid pBSGluc39-1/AHAS se rozštěpí enzymy KpnI a XbaI a podrobí se elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB200 z příkladu 19 C se rozštěpí týmiž enzymy a rovněž se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás, který obsahuje spojení glukonáza/AHAS a pás, obsahující vektor pCIB200 pro expresi se vyříznou, smísí a DNA se váže za vzniku plasmidu pCIB200/Gluc39.1-AHAS.

Obdobným způsobem se rozštěpí plasmid pBSGlu39.3/AHAS a naváže se na rozštěpený plasmid pCIB200 za vzniku plasmidu pCIB200/Glu39.3-AHAS.

B. Příprava plasmidů pBSGluc39.1/AHAS a pBSGluc39.3/AHAS

Plasmid pBSGluc39.1/GUS z příkladu 26 se rozštěpí enzymy NcoI a XbaI a podrobí se elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí.

Plasmid pCIB1207 z příkladu 22 C se rozštěpí týmiž enzymy a rovněž se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás, který obsahuje 5'-část genu pro glukonázu a vektor a pás, který obsahuje kódový řetězec AHAS se vyříznou, smísí a DNA se naváže za vzniku plasmidu pBSGluc.39.1/AHAS.

Obdobným způsobem se rozštěpí plasmid pBSGluc39.3/GUS z příkladu 27 a naváže se na rozštěpený plasmid pCIB1207 za vzniku plasmidu pBSGluc39.3/AHAS.

P ř í k l a d 31

Příprava plasmidu pCIB200/Gluc39.1-AHAS-SuR a plasmidu pCIB200/Gluc39.3-AHAS-SuR

A. Vazba s pCIB200

Plasmid pBSGluc39.1/AHAS-SuR se rozštěpí enzymy KpnI a XbaI a materiál se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB200 z příkladu 19 C se rozštěpí týmiž enzymy a rovněž se podrobí elektroforéze na 0,8% agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Pás, který obsahuje spojení glukonáza/AHAS-SuR a pás, který obsahuje

vektor pCIB200 pro expresi se vyříznou, smísí a DNA se naváže za vzniku plasmidu pCIB200/Gluc39.1-AHAS-SuR.

Obdobným způsobem se rozštěpí plasmid pBSGluc39.3/AHAS-SuR a naváže se na rozštěpený plasmid pCIB200 za vzniku plasmidu pCIB200/Gluc39.1-AHAS-SuR.

B. Příprava plasmidu pBSGluc39.1/AHAS-SuR a
plasmidu pBSGluc39.3/AHAS-SuR

Plasmidy pBSGluc39.1/GUS z příkladu 26 a pBSGluc39.3/GUS z příkladu 27 se rozštěpí enzymy NcoI a XbaI a fragmenty po působení restričních enzymů se oddělí na 0,8% TAE agarosovém gelu s nízkou teplotou tuhnutí. Plasmid pCIB1208 z příkladu 23 C se rozštěpí týmiž enzymy a fragment o 3,3 kb, obsahující mutovaný gen AHAS (odolný proti herbicidu sulfonylmočovině, SuR) se izoluje elektroforézou na agarosovém gelu. Fragmenty, které obsahují promotor glukuronidázy a vektor pBS se vyříznou, roztaví a provádí se vazba s fragmentem AHAS za vzniku klonů, které byly označeny pBSGluc39.1/AHAS-SuR a pBSGluc39.3/AHAS-SuR.

4. Identifikace nových genů

V následujícím příkladu se popisuje izolace a charakterizace zbývajících genů pro nové bílkoviny PR.

P ř í k l a d 32

Izolace dalších klonů genomu cDNA

A. Izolace klonu genomu, který je kódem pro PR-1'

Vytvoří se sestava genomu a tato sestava se pak sleduje sondou cDNA pro PR-1 způsobem podle příkladu 11. Izoluje se klon, který se označí lambdatobchrPR1019. Zjistí se předběžná mapa míst působení restrikčních enzymů. Fragment po působení enzymu ClaI se subklonuje v plasmidu Bluescript a pak se zjistí mapa míst působení restrikčních enzymů plasmidu pBS-PR1019Cla. Z tohoto plasmidu se odstraní velký fragment XhoI za vzniku plasmidu pBS-PR1013Cla Δ Xho. Tento plasmid obsahuje přibližně 2,7 kb DNA tabáku s obsahem genu PR1019. Z tohoto plasmidu se vypouští části a tímto způsobem se určí celý řetězec DNA.

Řetězec DNA pro přibližně 2100 bp tohoto genu je znázorněn jako řetězec 2. Bílkovina, pro niž je kódem PR1019 je přibližně na 65 % homologní s PR-1a, PR-1b nebo PR-1c, z tohoto důvodu byl nový gen nazván PR-1'.

B. Izolace klonu cDNA, který je kódem pro chitinázu okurky

Bílkovina typu chitinázy byla izolována po indukci patogenem z infikovaných listů okurky způsobem podle publikace Metraux J. P. a další, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33, 1 - 9 (1988). Z tohoto homogenního preparátu bílkoviny se izolují peptidy v podstatě způsobem, který je v oboru znám a který byl popsán v příkladech 9 a 10. Byly izolovány dva typy bílkoviny a byly syntetizovány oligonukleotidové sondy tak, že jsou komplementární se všemi možnými kombinacemi mRNA, která by mohla vytvořit kód pro uvedené peptidy. Sondy měly následující řetězce:

G T A

Sonda 1: 5'-CCATTCTGNCCCCAGTA-3'

G G G G C

Sonda 2: 5'-GGATTATTATAAAATTGNACCCA-3'.

Okurkové listy se infikují virem nekrózy tabáku (TNV) a RNA se izoluje 5 dnů po infekci způsobem podle příkladu 5. Poly A+ RNA se izoluje standardním způsobem a pak se připraví sestava cDNA ve vektoru pro klonování lambda Zap (Stratagene), v podstatě způsobem podle publikace Gubler U. a Hoffmann B.J., Gene 25, 263 (1983). 300 000 plaků se nanese na plotny a dvakrát přenesse na filtry a pak zkoumá působení sondy 1, kterou je směs 1 oligonukleotidů, značené ^{32}P nebo sondou 2. Plaky, které poskytují pozitivní výsledky při sledování pomocí některé sondy se izolují. Pak se provádí izolace fágů a automatické vyříznutí příslušných částí izolačního materiálu způsobem, popsaným výrobcem v příručce Stratagene Lambda Zap laboratory manual.

Po izolaci klonů cDNA pro chitinázu v plasmidu Bluescript se stanoví řetězec uvedených klonů. Řetězec genu pro chitinázu je uveden jako řetězec 3.

C. Izolace klonu cDNA, který je kódem pro hlavní formu
PR-R

Listy *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc se infikují virem mozaiky tabáku a 5 dnů po infekci se otrhají. Celková RNA se připraví způsobem podle příkladu 5

a pak se připraví poly A+ RNA při použití běžných postupů. Při použití této poly A+ RNA se vytvoří sestava cDNA ve vektoru pro klonování Lambda onC (Stratagene). Přibližně 300 000 pádků se sleduje pomocí oligonukleotidové sondy s řetězcem

5'-GAACTTCCTAAAAGCTTCCCCTTTTATGCC-3',

Positivní plaky se čistí ze získaného materiálu standardním způsobem a z fágu se připraví DNA. Fragmenty rekombinantního fágu, který obsahuje cDNA se podrobí subklonování v plasmidu Bluescript. Řetězec této cDNA se stanoví běžnou analýzou řetězce. Řetězec jednoho z klonů, který je kódem pro hlavní formu PR-R podle publikace Pierpoint W. S. a další, *Physiol. Plant Pathol.* 31, 291 (1987) byl uveden jako řetězec 4. Bílkovina, při níž je kódem uvedený řetězec má velkou homologii se známým inhibitorem trypsinu/alfa-amylázy, který byl izolován z kukuřice a popsán v publikaci Richardson M. a další, *Nature* 327, 432 (1987). Klonovaný PR-R může být kódem pro inhibitor proteáz nebo alfa-amyláz a jako takový by přenášel na rostliny insekticidní, viricidní nebo fungicidní účinnost v případě transgenické exprese.

D. Izolace cDNA, která je kódem pro PR-Q

Listy *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc se infikují virem mozaiky tabáku a 5 dnů po infekci se otrhají. Připraví se celková RNA způsobem podle příkladu 5 a izoluje se polyA⁺ RNA při použití standardních postupů. Sestava cDNA se zkounstruuje při použití této polyA⁺ RNA ve vektoru pro klonování LambdaOngC (Stratagene). Přibližně 300 000 plaků se sleduje při použití značené sondy cDNA, která je kódem pro zásaditou chitinázu tabáku, popsanou v publikaci Shinski a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 89 - 93 (1987), filtry se promývají při teplotě 50 °C v pufru, který obsahuje 0,125 mM chloridu sodného, 1 % SDS, 40 mM fosforečnanu sodného o pH 7,2 a 1 mM EDTA. 24 pozitivních plaků se čistí, řetězec DNA jednoho z klonů, který byl nazván pBScht15 se analyzuje. Tento řetězec byl znázorněn jako řetězec 7.

Bílkovina PR-Q se částečně čistí z intracelulární tekutiny tabákových listů, infikovaných TMV způsobem podle příkladu 8. Frakce po chromatografii na prostředku Ultragel ACA54 s obsahem PR-O, PR-P, PR-Q a PR-R se spojí a lyofilizují. Pak se bílkoviny dále čistí elektroforézou na polyakrylamidovém poli. Pás s obsahem bílkoviny PR-Q se vyřízne a bílkovina se izoluje

podle doporučení Applied Biosystems User Bullerin č. 36, 21. března 1988. Bílkovina se zpracuje působením pyroglutanátamidopeptidázy a pak se stanoví její řetězec automatickou Edmanovou degradací podle příkladu 9. Řetězec na aminoterminálním zakončení bílkoviny PR-Q se stanoví a bylo prokázáno, že jde o řetězec

GlnGlyIleGlySerIleValThrXxxAspLeuPheAsnGluMetLeu ,

kde Xxx znamená aminokyselinu, jejíž povaha je nejasná,

Bylo prokázáno, že bílkovina, pro niž je kódem řetězec 7, je bílkovina Q, která se vztahuje k pathogenetickým příčinám, přičemž 1) má omezenou strukturální homologii se zásaditou chitinázou tabáku a 2) její aminoterminální řetězec je totožný s bílkovinou PR-Q podle analýzy řetězce.

E. Izolace cDNA, která je kódem pro kyselou formu β -1,3-glukanázy

Přibližně 300 000 plaků sestavy cDNA, popsané v příkladu 32 D se sleduje při použití značené sondy cDNA, která je kódem pro zásaditou formu β -1,3-glukanázy podle publikace Shinski H. a další, tak jak bylo svrchu uvedeno, filtry se promývají při

teplotě 50 °C ve směsi 0,125 M chloridu sodného, 1 % SDS, 40 mM fosforečnanu sodného o pH 7,2 a 1 mM EDTA. Izoluje se 15 pozitivních plaků a včleněná část se subklonuje v plasmidu Bluescript. Částečné stanovení řetězce DNA ukáže, že klony 5 a 6 mají totožnou cDNA, s přibližně 55% homologií se známým řetězcem DNA pro zásaditou formu β -1,3-glukanázy. Řetězec cDNA v klonu 5 a 6 se stanoví, tento řetězec je znázorněn jako řetězec 8. Tato cDNA je zřejmě kódem pro kyselou formu β -1,3-glukanázy vzhledem k omezené homologii aminokyselin a vzhledem ke kyselějšímu isoelektrickému bodu bílkoviny, pro niž je tato cDNA kódem.

F. Izolace klonu genomu, který je kódem pro chitinázu okurky

Z *Cucumis sativus* cv. Long Marketer se oddělí jádra a DNA se izoluje způsobem podle příkladu 11. Pak se 3 μ g této DNA rozštěpí enzymy EcoRV, EcoRI, BamHI nebo HindIII a fragmenty se oddělí na 0,5% agarosovém gelu. Analýza Southern blot při použití značené sondy pro cDNA chitinázu okurky (řetězec 3) prokáže v rozštěpeném materiálu po působení enzymu EcoRI jediný pás o velikosti přibližně 12 kb. Bylo proto rozhodnuto izolovat

gen pro chitinázu okurek při použití materiálu po štěpení enzymem EcoRI s jeho následnou vazbou na vektor pro klonování typu lambda.

10 μ g svrchu izolované DNA se úplně rozštěpí působením EcoRI. Tato DNA se pak extrahuje fenolem, sráží ethanolem a naváže do místa působení enzymu EcoRI v EMBL 4. Přibližně 100 000 plaků se sleduje značenou sondou cDNA pro chitinázu okurky, řetězec 3. Deset pozitivních plaků se izoluje a čistí a včleněná DNA se analyzuje předběžným stanovením míst působení restričních enzymů. U všech klonů byly získány stejné výsledky, jeden z nich byl izolován pro další analýzu. Včleněný fragment o 12 kb z tohoto klonu byl pak podroben subklonování v plasmidu Bluescript za vzniku plasmidu pBScucchi/chitinase. Pro tuto klonovanou DNA byla stanovena mapa míst působení restričních enzymů, fragmenty byly podrobeny dalšímu subklonování a byl stanoven řetězec DNA.

G. Izolace klonu genomu, který je kódem pro kyselou
 β -1,3-glukanázu

Byla zkonstruována sestava genomu způsobem podle příkladu 11 a byla sledována při použití klonu cDNA pro kyselou β -1,3-glukanázu z příkladu 32 E.

Izoluje se klon typu lambda a fragment o 1 kb po štěpení enzymem EcoRI tohoto klonu se subklonuje v plasmidu Bluescript způsobem, popsáným v příkladu 32 A. Uvedený klon byl nazván pBSGL6e.

5. Stálá transformace a regenerace rostlin

Rostlinné tkáně je možno transformovat při použití svrchu popsáných vektorů jakýmkoliv známým způsobem. Tyto metody, použité pro přenos DNA do rostlinných buněk zahrnují například přímou infekci nebo současnou kultivaci rostlin, rostlinných tkání nebo buněk s *A. tumefaciens* podle publikace Horsch R.B. a další, Science 225, 1229 (1985), Marton L., Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, sv. 1, 514 - 521, (1984), zpracování protoplastů působením exogenní DNA způsoby, které byly popsány v následujících publikacích: Paszkowski J. a další, EMBO J. 3, 2717 (1984), evropský patentový spis č. 164 575, Shillito R. D. a další, Bio/Technology 3, 1099 (1985), Potrykus I., a další, svrchu, Loerz H. a další, Mol. Gen. Genet. 199, 178 (1985), Fromm M. a další, svrchu, britský patentový spis č. 2 140 822 a Negrutiu I. a další, Plant Mol. Biol. 8, 363 (1987), inkubace s polyethylenglykolem (PEG) podle

svrchu uvedené publikace Negrutiu I. a další, svrchu, mikroinjekce podle publikace Reich T. J. a další, Bio/-/Technology 4, 1001 - 1004 (1986), a Réich T. J. a další, Can. J. Bot. 64, 1259 - 1267 (1986) a bombardování mikroprojektily podle publikace Klein T. M. a další, Nature 327, 70 (1987).

P ř í k l a d 33

Transformace Agrobacterium

DNA z plasmidů pCIB270 z příkladu 16, pCIB271, pCIB272 a pCIB273 z příkladů 19 D, E a F se čistí při použití gradientu cesiumchloridu a ethidiumbromidu a pak se užije k transformaci *A. tumefaciens*, kmen Al36, který obsahuje pomocný plasmid pCIB542 způsobem, popsaným v publikaci Hölsters M. a další, Mol. Gen. Genet. 163, 181 - 187 (1978), čímž se získají kmeny CIB270, CIB271, CIB272 a CIB273.

Při použití téhož postupu se užijí plasmidy pCIB271, pCIB272 a pCIB273 k transformaci virulentních kmenů *A. tumefaciens* 15955, A208, A281 a kmene *A. rhizogenes* A4, čímž se získají kmeny, které se označují jako pCIB271 x 15955, pCIB271 x A208, pCIB271 x A281,

pCIB271 x A4, pCIB272 x 15955, pCIB272 x A208, pCIB272 x A281, pCIB272 x A4m pCIB273 x 15955, pCIB273 x A208, pCIB273 x A281 a pCIB273 x A4.

Agrobacterium kmen CIB542 je kmen EHA101, popsaný v publikaci Hood a další, J. Bacteriol. 168, 1291 - 1301 (1986), v němž bylo označené kanamycinem v plasmidu nahrazeno částí spectinomycin/streptomycin z Tn7.

P ř í k l a d 34

Transformace kotoučů z tabákových listů

Agrobacterium, kmeny CIB270, CIB271, CIB272 a CIB273 se pěstují 18 až 24 hodin v prostředí se solemi glutamátu při pH 6, prostředí je doplněno 0,15 % mannitolu, 50 µg/ml kanamycinu, 50 µg/ml spectinomycinu a 1 mg/ml streptomycinu a pak se ředí na optickou hustotu₆₀₀ 0,2 tímtež prostředím bez antibiotika. Pak se bakterie pěstují 3 až 5 hodin, načež se prostředí zředí na optickou hustotu₆₀₀ v rozmezí 0,2 až 0,4 pro naočkování kotoučů s průměrem 5 až 7 mm, vyříznutých z listů Nicotiana tabacum cv. xanthi, které byly pěstovány asepticky v nádržích GA7 způsobem, který je modifikací postupu

podle publikace Horsch R. a další, Science 227, 1229 až 1232 (1985).

Disky z listů se udržují na 0,7% agaru s obsahem hlavních a stopových prvků ve formě soli (MS) podle Murachigeho a Skooga, 1 mg/ml benzyladeninu a 1 mg/ml kyseliny α -naftalenoctové 2 dny, načež se přenesou do téhož prostředí, které obsahuje 50 μ g/ml kanamycinu, 100 μ g/ml carbanicillinu a 100 μ g/ml mefoxinu. Klíčky, které se vytvoří na těchto diskách se vyříznou a pěstují tak dlouho, až se získá 6 rostlinek dalším pěstováním těchto výhonků v prostředí MS s obsahem 50 μ g/ml kanamycinu v nádržkách GA7.

Rostlinky se nechají zakořenit v prostředí, které neobsahuje hormony, avšak obsahuje 50 μ g/ml kanamycinu, přenesou se do půdy a zpracují se ve phytotronu před přenosem do skleníku pro indukci působením chemických regulátorů. V době kvetení se indukuje tvorba samosprašných květů. Semena se sklídí po jejich dozrání.

Indukce se provádí obdobným způsobem jako v příkladu 63, 66 a v tabulce II a výsledky se zpracovávají obdobným způsobem.

P ř í k l a d 35

Produkce transgenického kalu tabáku a celých rostlin

Kmen *Agrobacterium* pCIN270 nebo pCIB271 se užíje k transformaci kalu, který se vytvoří z kotoučů, vyříznutých z listů podle příkladu 34. Kalus, který se vytvoří na selekčním prostředí MSBN s obsahem kanamycinu se udržuje na růstovém prostředí pro kalus, které sestává z hlavních a stopových solí MS a z Fe-EDTA (Gibco, 500 - 1117, 4,3 g/l), prostředí obsahuje dále vitaminy MS, 100 mg/l myoinositolu, 20 g/l sacharosy, 2 mg/l kyseliny naftalenoctové, a 0,3 mg/l kinetinu.

Kalus je možno užít k regeneraci transgenických rostlin tak, že se části kalu přenesou do prostředí MSBN a pak se postupuje způsobem, který byl popsán v příkladu 34. Kalus je možno také užít k měření indukce genu po aplikaci indukčního chemického regulátoru a ke sledování chemických látek, které jsou schopné způsobit indukci genu.

P ř í k l a d 36

Transformace karotky

Agrobacterium kmeny CIB270, CIB271, CIB272, CIB273, pCIB271 x 15955, pCIB271 x A208, pCIB271 x A281, pCIB271 x A4, pCIB272 x 15955, pCIB272 x A208, pCIB272 x A281, pCIB272 x A4, pCIB273 x 15955, pCIB273 x A208, pCIB273 x A281 a pCIB273 x A4 se pěstují způsobem podle příkladu 34. Bakterie, zředěné na optickou hustotu₆₀₀ v rozmezí 0,2 až 0,4 se pak užijí pro naočkování kotoučů, vyříznutých z karotky, sterilizované na povrchu.

K povrchové sterilizaci se karotky oloupou a pak se máčí 20 minut v 10% roztoku chloroxu. Pak se karotky opláchnou sterilní vodou, rozřežou se na kousky o tloušťce 5 mm a uloží bazální stranou na agar. 20 až 50 μ l roztoku bakterií se pak nanese na horní povrch kotoučů. Po 7 dnech se pak kotouče přenesou na 0,7% agar s obsahem solí MS, 3% sacharósy, 0,1 mg/l 2,4-D, 50 μ g/l kanamycinu, 100 μ l/ml carbenicilinu a 100 μ g/ml mefoxinu. Kalus, tvořící se kolem kambiálního kruhu se vyřízne a uloží na 0,7% agar MS, doplní 3 % sacharósy, 0,1 mg/l 2,4-D, 50 μ g/ml kanamycinu, 100 μ g/ml carbenicilinu a 100 μ g/ml mefoxinu. Jakmile kalus vyroste, rozdělí se na malé kousky do čtyř ploten se stejným prostředím. Jakmile kalus plotnu vyplní, postříkají se tři plotny vodou, 50 mM salicylátem sodným o pH 5,6 nebo 250 μ g/l methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu

k indukci exprese chimérního genu PR-1a/GUS.

Pokusy s indukcí a jejich výsledky jsou popsány v příkladu 63 a 66.

P ř í k l a d 37

Transformace slunečnice

Agrobacterium kmeny CIB270, CIB271, CIB272, CIB273, pCIB271 x 15955, pCIB271 x A208, pCIB271 x A281, pCIB271 x A4, pCIB272 x 15955, pCIB272 x A208, pCIB272 x A281, pCIB272 x A4, pCIB273 x 15955, pCIB273 x A208, pCIB273 x A281 a pCIB273 x A4 se pěstují způsobem, popsaným v příkladu 34. Bakterie, zředěné na optickou hustotu₆₀₀ v rozmezí 0,2 až 0,4 se pak užijí k naočkování stonků slunečnic, které se připraví následujícím způsobem:

Slunečnicová semena se máčí 10 minut v 10% roztoku captanu a pak ještě 10 minut v 10% roztoku chloroxu, načež se opláchnou sterilní vodou. Pak semena zbaví slupky a nechají se klíčit ve tmě 3 dny v 0,7% agaru, načež se uloží do inkubátoru při teplotě 23 °C, inkubátor se nastaví tak, aby 12 hodin byl den a 12 ho-

din byla noc. Semenáčky se týden pěstují, pak se oddělí jejich horní část a na řeznou plochu stonku se naočkují bakterie.

Po jednom týdnu se naočkované stonky kmenem CIB270, CIB271, CIB272 nebo CIB273 odříznou a uloží se na 0,7% agar s obsahem solí MS, 3 % sacharósy, 2 mg/ml kyseliny α -naftalenoctové, 1 mg/ml 6-benzylaminopurinu, 100 μ g/ml carbenicilinu, 100 μ g/ml mefoximu a 50 μ g/ml kanamycinu. Stonky, které byly naočkovány pCIB271 x 15955, pCIB271 x A208, pCIB271 x A281, pCIB271 x A4, pCIB272 x 15955, pCIB272 x A208, pCIB272 x A281, pCIB272 x A4, pCIB273 x 15955, pCIB273 x A208, pCIB273 x A281 a pCIB273 x A4 se odříznou a uloží se na 0,7% agar, obsahující soli MS, 3 % sacharósy, 100 μ g/ml carbenicilinu a 100 μ g/ml mefoximu. Kalus se přenesse do čerstvého prostředí každé dva týdny tak dlouho, až se získá dostatečné množství pro čtyři plotny. Polovina kalů z virulentních kmenů *Agrobacterium* se přenesse do prostředí bez obsahu hormonů s obsahem 50 μ g/ml kanamycinu. Jakmile se dosáhne dostatečného množství kalu za přítomnosti nebo v nepřítomnosti kanamycinu, je možno kalus užít k pokusům s indukcí exprese genu, tak jak bylo uvedeno svrchu pro transformovaný kalus karotky.

P ř í k l a d 38

Transformace rajčete

Kmeny *Agrobacterium* CIB270, CIB271, CIB272, CIB273, pCIB271 x 15955, pCIB271 x A208, pCIB271 x A281, pCIB271 x A4, pCIB272 x 15955, pCIB272 x A208, pCIB272 x A281, pCIB272 x A4, pCIB273 x 15955, pCIB273 x A208, pCIB273 x A281, a pCIB273 x A4 se pěstují způsobem podle příkladu 34. Bakterie, zředěné na optickou hustotu₆₀₀ v rozmezí 0,2 až 0,4 se pak použijí pro naočkování stonků semenáčků rajčat, připravených následujícím způsobem:

Semena rajčat se máčí 20 minut v 10% roztoku chloroxu a pak se opláchnou sterilní vodou. Pak se nechají semena klíčit na 0,7% agaru ve tmě 3 dny, načež se uloží do laboratorního inkubátoru při teplotě 23 °C, vytvoří se 12 hodin den a 12 hodin noc. Semenáčky se pěstují týden, načež se oddělí vrchol a bakterie se naočkují na řeznou plochu stonku."

Po jednom týdnu se stonky, naočkováné kmeny CIB270, CIB271, CIB272 nebo CIB273 oddělí a uloží do 0,7% agaru, který obsahuje soli MS, 3 % sacharósy, 2 mg/ml kyseliny α -naftalenocetové, 1 mg/ml 6-benzyl-

aminopurinu, 100,ug/ml carbenicilinu, 100,ug/ml mefoximu, a 50,ug/ml kanamycinu. Stonky, naočkované pCIB271 x 15955, pCIB271 x A208, pCIB271 x A281, pCIB271 x A4, pCIB272 x 15955, pCIB272 x A208, pCIB272 x A281, pCIB272 x A4, pCIB273 x 15955, pCIB273 x A208, pCIB273 x A281 a pCIB273 x A4 se odříznou a uloží se na 0,7% agar, obsahující soli MS, 3 % sacharósy, 100,ug/ml carbenicilinu a 100,ug/ml mefoximu. Kalus se přenese do čerstvého prostředí každé 2 týdny tak dlouho, až se získá dostatečné množství pro 4 plotny. Polovina kalu, vypěstovaného z virulentních kmenů *Agrobacterium* se přenese do prostředí bez hormonů s obsahem 50,ug/ml kanamycinu. Jakmile vyroste dostatečné množství kalu za přítomnosti nebo v nepřítomnosti kanamycinu, je možno jej užít k pokusům s indukcí stejným způsobem jako svrchu transformovaný kalus karotky.

P ř í k l a d 39

Transformace bavlníku

Agrobacterium, kmenu pCIB271 x 15955, pCIB271 x A208, pCIB271 x A281, pCIB271 x A4, pCIB272 x 15955, pCIB272 x A208, pCIB272 x A281, pCIB272 x A4,

pCIB273 x 15955, pCIB273 x A208, pCIB273 x A281 a pCIB273 x A4 se pěstují obdobným způsobem jako v příkladu 34. Bakterie, zředěné na optickou hustotu₆₀₀ v rozmezí 0,2 - 0,4 se pak použijí k naočkování kotyledonů bavlníku, připravených následujícím způsobem:

Bavlníková semena se máčí 20 minut v 10% roztoku chloroxu a pak se opláchnou sterilní vodou. Semena se nechají klíčit v 0,7% agaru ve vodě po tmě. Semenáčky se pěstují týden před naočkování bakterií na povrch kotyledonů.

Naočkované kotyledony se nechají vytvořit kalus, načež se oddělí a uloží do 0,7% agaru, obsahujícího soli MS, 3 % sacharósy, 100 µg/ml carbenicilinu a 100 µg/ml mefoximu. Kalus se přenesse do čerstvého prostředí každé tři týdny tak dlouho, dokud se nezíská dostatečné množství pro čtyři plotny. Polovina kalu, získaného z virulentních kmenů *Agrobacterium* se přenesse na prostředí bez hormonů s obsahem 50 µg/ml kanamycinu. Jakmile se získá dostatečné množství kalu, vypěstovaného za přítomnosti nebo v nepřítomnosti kanamycinu, je možno jej užít k provádění studií s indukcí exprese genu, tak jak byly svrchu popsány při použití transformovaného kalu^{ny}/karotky.

P ř í k l a d 40

Příprava zvláštního typu kaluSM Zea Mays, elitní inbrední
linie Funk 2717

Zea Mays, rostlinky inbrední linie Funk 2717 se pěstují ve skleníku až do kvetení a navzájem se spráší. Nezralá ouška embryí o délce přibližně 2 až 2,5 mm se z rostlin odstraní a sterilizují 20 minut v 10% roztoku chloroxu. Pak se embrya asepticky vyjmou ze zrn a nanesou na plotny s osou embrya, směřující směrem dolů, do prostředí OMS, které obsahuje 0,1 mg/l 2,4-D, 6 g/100 ml sacharósy a 25 mM L-prolinu v pevném prostředí s obsahem 0,24 g/100 ml Gelrite^R (iniciační prostředí). Po dvoutýdenním pěstování ve tmě při teplotě 27 °C se kalus, vyvíjející se na scutellu z embrya odstraní a nanese se na plotnu s prostředím B5 podle publikace Gamborg O. L. a další, Experimental Cell Research 50, 151 - 158 (1968) s obsahem 0,5 mg/l 2,4-D a 0,24 g/100 ml Gelrite^R ke zpevnění prostředí. Kalus se přenáší každé dva týdny do čerstvého prostředí. Po 8 týdnech od uložení embryí do iniciačního prostředí se zvláštní typ kalu identifikuje podle své charakteristické morfologie. Tento kalus se pak podrobí dalšímu pěstování v subkultuře na stejném prostředí.

Po 2 měsících se pak kalus přenese a dále se pěstuje v subkulturách na prostředí N6, které obsahuje 2 mg/l 2,4-D a je zpevněno prostředkem Gelrite^R.

P ř í k l a d 41

Příprava kultury Zea Mays, elitní inbrední linie Funk 2717 v suspenzi

Kalus, popsáný v příkladu 40 se pěstuje v subkultuře alespoň 6 měsíců. Typem kalu, který byl zvolen pro subkulturu je poměrně málo slizovitý a granulární kalus, který je možno snadno rozdělit na shluky jednotlivých buněk při jeho ukládání do kapalného prostředí. Kultury s obsahem agregátů s velkými buňkami se již dále nepěstují. Přibližně 500 mg tohoto kalu se vždy uloží do 30 ml prostředí N6 s obsahem 2 mg/l 2,4-D v Delongových baňkách s objemem 125 ml. Po týdnu pěstování při teplotě 26 °C ve tmě v třepací kultuře při 130 ot/min., výkyv 2,5 cm se prostředí nahradí čerstvým prostředím. Pak se suspenze stejným způsobem pěstují další týden. Po týdnu se kultury prohlédnou a ty kultury, v nichž se nenachází velké množství zvětšených buněk, se dále pěstují. Kultury s agregáty

zvětšených buněk se odloží. Výhodná tkáň sestává ze shluků dělicích se buněk s charakteristickým hladkým povrchem. Kultury, které byly dále pěstovány měly alespoň 50 % buněk v těchto malých agregátech s výhodnou morfologií. Tyto suspenze rovněž rychle rostly, počet buněk se zdvojnásobil za méně než jeden týden. Tyto kultury byly přenášeny, do čerstvého prostředí každý týden tak, že 0,5 ml usazených buněk (PCV) bylo přeneseno pipetou do 25 ml čerstvého prostředí. Po 4 až 6 týdnech pěstování tímto způsobem se kultury každý týden zvětšovaly tak, že se počet buněk v nich zdvojnásobil až ztrojnásobil. Ty kultury, v nichž více než 75 % buněk mělo požadovanou morfologii, byly dále pěstovány. Linie byla dále udržována tak, že se dále pěstovala v subkultuře vždy kultura z té baňky, jejíž obsah měl nejvýhodnější morfologii. V některých případech bylo použito občasné filtrace přes nerezové filtry s průměrem pórů 630 μ m, není to však nutné.

P ř í k l a d 42

Příprava protoplastů z kultur Zea Mays v suspenzi

1 až 1,5 ml usazených buněk (CV)
suspenzní kultury, připravené způsobem podle příkladu 41

se inkubuje v 10 až 15 ml filtrem sterilizované směsi, sestávající ze 4 g/100 ml cellulázy RS s 1 g/100 ml Rhozymu v prostředí KMC, které obsahuje 8,65 g/l chloridu draselného, 16,47 g/l chloridu hořečnatého. $6\text{H}_2\text{O}$ a 12,5 g/l chloridu vápenatého. $2\text{H}_2\text{O}$ a 5 g/l MES o pH 5,6. Inkubace se provádí při teplotě 30°C celkem 3 až 4 hodiny na výkyvném stole s pomalými výkyvy. Mikroskopem se v inverzi sleduje uvolňování protoplastů. Uvolněné protoplasty se oddělí následujícím způsobem: materiál se zfiltruje sítí nejprve s průměrem ok $100\text{ }\mu\text{m}$ a pak $50\text{ }\mu\text{m}$. Protoplasty se ze síta vymyjí prostředím KMC v tom objemu, který měla směs původně. 10 ml materiálu s obsahem protoplastů se uloží do zkumavek do odstředivky z plastické hmoty a přidá se 1,5 až 2 ml 0,6 M roztoku sacharósy, roztok je pufován na pH 5,6 přidáním roztoku kyseliny morfolinethansulfonové (MES a KOH) v množství 0,1 g/100 ml. Zkumavky se pak odstřeďují 10 minut při 60 až 100 g a protoplasty se odebírají pipetou a ukládají do čerstvé zkumavky. Přidá se 10 ml čerstvého roztoku KMC, protoplasty se uvedou do suspenze a odstřeďují se ještě 5 minut při 60 až 100 g. Supernatant se odloží a protoplasty se opatrně uvedou do suspenze ve zbývajících kapce, načež se přidá 10 ml 13/14 prostředí KMC. Po dalším pětiminutovém prostředí se supernatant znovu odstraní a protoplasty se znovu uvedou do suspenze

v roztoku KMC 6/7. Podíl se odebere pro počítání, protoplasty se znovu odstředí. Pak se uvedou protoplasty znovu do suspenze v množství 10^7 (10 milionů) na 1 ml v prostředí KM-8p z tabulky I nebo v 0,5 M mannitolu s obsahem 6 mM chloridu hořečnatého nebo v jiném vhodném prostředí pro použití k transformaci, tak jak bude popsáno v dalších příkladech. Tato suspenze protoplastů se užije k transformaci a je možno ji pěstovat obdobným způsobem jako v příkladech 43 a 44.

P ř í k l a d 43

Transformace protoplastů Zea Mays elektrickým otevřením pórů

A. Všechny stupně postupu s výjimkou tepelného šoku se provádějí při teplotě místnosti 22 až 28 °C. Protoplasty se znovu uvedou do suspenze v posledním stupni příkladu 42 v 0,5 M mannitolu s obsahem 0,1 g/100 ml MES a 6 mM chloridu hořečnatého. Odpor této suspenze se měří v komůrce přístroje Dialog Electroporator (DIA-LOG G.m.b.H., D-4000 Düsseldorf 13, NSR) a upraví se na 1 až 1,2 kOhm při použití roztoku 300 mM chloridu hořečnatého. Protoplasty se podrobí tepelnému

šoku ponořením zkumavky se vzorkem do vodní lázně s teplotou 45°C na 5 minut, načež se materiál zchladí na ledu na teplotu místnosti. Pak se přidá $4\text{ }\mu\text{g}$ lineari- zovaného plasmidu, který obsahuje gen pro odolnost proti hygromycinu, který je možno podrobit selekci v rostlinách, například popsáný v publikaci Rothstein S. J. a další, svrchu, nebo chimérní gen, tak jak byl popsán v příkladech 19 až 31 a $20\text{ }\mu\text{g}$ nosné DNA z telecího brzlíku, vždy k $0,25\text{ ml}$ této suspenze. K protoplastům se přidá $0,125\text{ ml}$ roztoku polyethylenglykolu (PEG) s molekulovou hmotností 8000 o koncentraci $24\text{ g}/100\text{ ml}$ v $0,5\text{ M}$ mannitolu s obsahem 30 mM chloridu hořečnatého. Směs se opatrně, avšak důkladně promíchá a pak se 10 minut inkubuje. Vzorek se přenese do komůrky zařízení pro otevření pórů elektrickým proudem a vzorky se podrobí pulzům o trvání 10 sekund, obvykle třem pulzům při počátečním napětí 1500, 1800, 2300 nebo 2800 Vcm^{-1} , exponenciální doba rozpadu je $10\text{ }\mu\text{sec}$.

Protoplasty se pěstují následujícím způsobem. Vzorky se nanesou na prostředí v Petriho miskách o průměru 6 cm při teplotě místnosti. Po 5 až 15 minutách se přidají 3 ml prostředí KM-8p z tabulky I s obsahem $1,2\text{ g}/100\text{ ml}$ agarosy SeaPlaque a $1\text{ mg}/1$ 2,4-D. Agarosa a protoplasty se promísí a prostředí se nechá ztuhnout.

B. Opakuje se postup z příkladu 43 A s jednou nebo větším počtem následujících modifikací:

- 1) odolnost vzorku protoplastu se upraví na hodnotu 0,5 až 0,7 kOhm.
- 2) Užije se polyethylenglykol s molekulovou hmotností 4000.
- 3) Nepřidá se žádný polyethylenglykol nebo se přidá polovina objemu polyethylenglykolu s koncentrací 12 g/100 ml.
- 4) Pulsy se aplikují v intervalech 3 sekundy.
- 5) Protoplasty se po otevření kódů uloží do misek, uchovávaných na teplotě 16 °C.
- 6) Protoplasty se po otevření pórů vloží do zkumavek, promyjí se v 10 ml 6/7 prostředí KMC nebo roztokem W5, který obsahuje 380 mg/l chloridu draselného, 18,375 g/l chloridu vápenatého. $2\text{H}_2\text{O}$, 9 g/l chloridu sodného a 9 g/l glukósy při pH 6,0, načež se vzorky odstřeďují při 60 g celkem 10 minut, znovu se uvedou do suspenze v 0,3 ml prostředí KM a pěstují jako v odstavci A.
- 7) Nosná DNA z telecího brzlíku se nepřidává.

P ř í k l a d 44

Transformace protoplastů Zea mays působením polyethylen-
glykolu (PEG)

A. V posledním stupni příkladu 42 se protoplasty uvedou do suspenze v 0,5 M mannitolu s obsahem 12-30 mM chloridu hořečnatého. Pak se provádí tepelný šok po dobu 5 minut při teplotě 45⁰ stejně jako v příkladu 43. Protoplasty se po jednotlivých podílech rozdělí pro transformaci do zkumavek pro odstředivky v množství 0,3 ml protoplastů na 1 zkumavku. V průběhu následujících 10 minut se přidá DNA stejně jako v příkladu 43 a roztok polyethylenglykolu s molekulovou hmotností 6 000 s obsahem 40 g/100 ml PEG a s obsahem 0,1 M dusičnanu vápenatého a 0,4 M mannitolu o pH 8 až 9 po úpravě hydroxidem draselným, konečná koncentrace je 20 g PEG/100 ml. Jednotlivé podíly se inkubují celkem 30 minut za občasného opatrného protřepání a pak se protoplasty uloží do petriho misek (0,3 ml původní suspenze protoplastů na misku o průměru 6 cm) a protoplasty se pěstují stejným způsobem jako v příkladu 43.

B. Opakuje se způsob podle příkladu 44A a protoplasty se po 30 minutách promyjí po inkubaci s roz-

tokem PEG podle příkladu 44A, promytí se provádí přidáním 0,3 ml roztoku W5 petkrát v intervalech dvou až tří minut. Suspenze protoplastů se pak odstředí, supernatan se odstraní a protoplasty se pěstují jako v příkladu 43A.

C. Opakuje se postup podle příkladů 44A a 44B s tím rozdílem, že koncentrace PEG (konečná koncentrace) se pohybuje v rozmezí 13 až 25 g/100 ml.

P ř í k l a d 45

Regenerace kalu⁰ z protoplastů

Plotny, které obsahují protoplasty v agaróze se uloží do tmy při teplotě 26°C. Po 14 dnech se počnou z protoplastů vyvíjet kolonie. Agaróza s koloniemi se přenese na povrch petriho misky s průměrem 9 cm s obsahem 30 ml prostředí N6, uvedeného svrchu v tabulce I s obsahem 2 mg/l 2,4-D, prostředí obsahuje pro zpevnění 0,24 g/100 ml prostředku Gelrite^R. Toto prostředí se uvádí jako 2N6. Kalus se dále pěstuje ve tmě při teplotě 26°C a částice kalu⁰ se pak přenášejí pro pěstování v subkultuře každé dva týdny do čerstvého živného prostředí 2N6.

P ř í k l a d 46

Selekce transformovaného kalu Zea Mays

Opakuje se postup podle příkladu 45 s tím rozdílem, že se k prostředí 2N6 přidá 100 mg/l nebo 200 mg/l hygromycinu B k selekci transformovaných buněk.

P ř í k l a d 47

Regenerace rostlinek kukuřice

Kalus se uloží do prostředí 2N6 k udržování a do prostředí ON6 (prostředí N6 bez 2,4-D) a do prostředí N61 (prostředí N6 s obsahem 0,25 mg/l 2,4-D a 10 mg/l kinetinu) k iniciaci regenerace. Kalus, pěstovaný na prostředích ON6 a N61 roste na světle (16 hodin denního světla o 10 až 100 μ Einsteinů/m².sec z bílé fluorescenční lampy). Kalus, pěstovaný na prostředí N61 se přenese po dvou týdnech na prostředí ON6, protože delší doba pobytu v prostředí N61 by mohla rostlinky poškodit. Kalus se přenáší do čerstvého živného prostředí každé dva týdny i když má být opět přenesen zpět do prostředí s týmž složením. Rostlinky se počnou tvořit přibližně po čtyřech až osmi týdnech. Jakmile jsou rostlinky vysoké alespoň 2 cm, přenesou se do prostředí

ON6 v nádržkách GA7. Kořeny se vytvoří v průběhu dvou až čtyř týdnů a jakmile jsou kořínky dostatečně dlouhé, aby unesly rostlinku, přenesou se rostlinky do půdy v rašelínových květináčcích za mírného zastínění po dobu prvních 4 až 7 dnů. Je často užitečné překrýt transplanted rostlinky průhledným kelímkem z plastické hmoty, aby se otužily. Jakmile rostlinky zakoření, je možno s nimi zacházet jako s běžnými rostlinkami kukuřice a pěstovat je ve skleníku až do dosažení zralosti. Aby bylo možno dosáhnout potomstva, je možno podrobit rostliny samoopylení nebo je zkřížit s divokým typem.

B. Opakuje se postup podle příkladu 47A s tím rozdílem, že se k prostředí pro udržování kalu přidá 100 mg/l nebo 200 mg/l hygromycinu B.

P ř í k l a d 48

Příprava suspenze embryí ze tkáně *Dactylis glomerata* L.

A. Embryonální kalus se připraví z bazálních částí nejmladších lístků *Dactylis glomerata* L., pěstované ve skleníku způsobem podle publikace Hanning G.E. a další, Theor. Appl. Genet., 63, 155-159 (1982). Listy se

na povrchu sterilizují ponořením do roztoku Clorox (The Clorox Company, Oakland, Ca.) v ředění 1 : 10 (5,25% chlornan sodný) na dobu 10 minut a pak se za aseptických podmínek rozřežou na malé segmenty o délce nebo v průměru 1 až 5 mm. Tyto segmenty se pak uloží do ploten na sterilní prostředí SH-30 s obsahem 0,8 % agarozy jako látky pro tvorbu gelu. Kalus nebo embryogenní struktura se objeví po 2 až 6 týdnech při inkubaci kultury při teplotě 25° C. Embryogenní kalus se udržuje v subkultuře, do níž se přenáší každé dva až čtyři týdny, užívá se čerstvého prostředí SH-30, kultura se pěstuje ve tmě při teplotě 25°C.

B.Suspenze embryogenní tkáně se získá tak, že se uloží přibližně 0,5 g čerstvé hmotnosti embryogenního kalu do 50 ml kapalného prostředí, které bylo popsáno v publikaci Gray D.J. a další, Plant Cell Tissue Organ Cult., 4, 123 - 133 (1985) s obsahem 45 μ M dicamba a 4g/l hydrolyzátu kaseinu. Kultura se pěstuje v suspenzi při teplotě 27° C a při osvitu 16 hodin denně (40 μ E-m²sec) na třepacím zařízení při 130 otáčkách za minutu s výkyvem 2,5 cm v Delongových baňkách s objemem 125 ml, uzavřených kovovým uzávěrem a parafilmem^R. Po přibližně 4 týdnech se velké shluky počnou usazovat za přibližně 30 sec. V této době se odeberou podíly po 10 ml supernatantu s obsahem malých shluků

buněk a tento podíl se přenese do 50 ml čerstvého prostředí. Tento postup se opakuje každé 3 až 4 týdny při použití nejúspěšnějších kultur jako očkovacího materiálu podle malých shluků buněk a podle malých cytoplasmatických buněk. Po 5 až 8 přenosech se suspenze považuje za v podstatě prostou neembryogenních buněk a většina shluků embryogenních buněk je malá (150 až 2 000 μ m.).

P ř í k l a d 49

Izolace a čištění protoplastů Dactylis Glomerata L.

Protoplasty se připravit ze suspenze, získané způsobem podle příkladu 48 tím způsobem, že se buňky zfiltrují za aseptických podmínek ve filtračním zařízení Nalgene^R s filtrem o 0,2 μ m a pak se přidá 0,5 g čerstvých buněk vždy ke 12,5 ml enzymatické směsi pro protoplasty v petriho misce. Enzymatická směs obsahuje 2g/100 ml Celulázy RS, 7 mM $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,7 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 3 mM MES o pH 5,6, glukózu (550 mOs/kg vody o pH 5,6), směs se sterilizuje filtrací. Pak se směs protřepává 4 až 5 hodin na třepačce při 50 otáčkách za minutu v tlumeném světle (méně než 5 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{sec}$). Pak se směs nechá projít sítem z nerezové o-

celi s průměrem otvorů $100\text{ }\mu\text{m}$ a pak se rozdělí do 12 zkumavek do odstředivky a pak se odstřeďuje při 60 až 100 g po dobu 5 minut. Sediment s obsahem protoplastů se pak třikrát promyje prostředím KM-8p, upraveným na 550 mOs/kg H_2O glukózou. V tomto stupni je možno ještě včlenit flotační stupeň k dalšímu čištění protoplastů. V tomto případě se promyté protoplasty navrství na 10 ml živného prostředí KM-8p po jeho úpravě na 700 mOs/kg H_2O sacharózou. Po odstředění při 60 až 100 g celkem 10 minut se protoplasty, nacházející se na rozhraní odeberou jemnou pipetou. Nakonec se protoplasty znovu uvedou do suspenze v 1 až 2 ml prostředí KM-8p a směs se nechá projít sítí z nerezové oceli s průměrem otvorů $20\text{ }\mu\text{m}$. Protoplasty se izolují, promyjí a pak se znovu uvedou do suspenze v prostředí KM-8p pro pěstování v osmoticky upraveném prostředí, vhodném pro transformaci způsobem podle příkladů 51 až 53.

P ř í k l a d 50

Pěstování protoplastů a růst kalu *Dactylis glomerata* L.

A. Čištěné protoplasty se nanesou v množství 5×10^5 protoplastů na 1 ml v prostředí KM-8p na plotny.

Prostředí KM-8p obsahuje 1,3 g/100ml agarozu SeaPlaque^R (FMC Corp., Marine Colloids Division, Rockland, Maine, USA) a 30 až 40 % prostředí, získaného z 3 až 4 týdnů staré kultury *Dactylis glomerata* L., jde o embryogenní suspenzi po odfiltrování prostředí přes sterilní filtr Nalgenne^R s průměrem pórů 0,2 μ m, prostředí se upraví na hodnotu 550 mOsm/kg H₂O přidáním glukózy, načež se filtr znovu sterilizuje. Pak se plotny uloží do tmy při stálé teplotě 28°C. Po 10 až 14 dnech se agarozu rozřeže a užije k založení kultur způsobem, popsáním v publikaci Shillito R.D. a další, Plant Cell Reports, 2, 244-247 (1983) při použití 20 ml suspenze v prostředí SH-45 s 3 g/100 ml sacharozy vždy na 3 ml kultury v agarozu. Plotny se uloží na třepačku a protřepávají se při 50 otáčkách za minutu na světle o 8 μ E/m²sec. Nová kultura v suspenzi se vytvoří při růstu kolonií ven z agarozy s uvolněním buněk do kapalného prostředí. Výsledné buňky, pěstované v suspenzi se nanesou na prostředí SH-30, zpevněné agarozou a uloží se do tmy při teplotě 25°C až do tvorby kalu.

B. Protoplasty se pěstují způsobem, uvedeným v příkladu 50A s tím rozdílem, že se do živného prostředí nepřidává žádná další látka k jeho úpravě.

P ř í k l a d 51

Transformace protoplastů *Dactylis glomerata* elektrickým
otevřením pórů

A. Bezprostředně po čištění protoplastů se provádí otevření pórů elektrickým proudem způsobem podle publikace Shillito R.D. a další, Bio/Technology 3, 1099-1103 (1985) při použití linearizovaného plasmidu, popsáno v příkladu 20. Protoplasty se znovu uvedou do suspenze po posledním promytí v množství přibližně 7×10^6 protoplastů/ml v pufru pro otevření pórů elektrickým proudem (0,4 M mannitol, 6 mM $MgCl_2$). Protoplasty se uloží po podílech 0,7 ml do zkumavek pro odstředivky s objemem 10 ml. Pak se ke zkumavkám přidá DNA plasmidu z příkladu 20 a DNA z telecího brzlíku (Sigma), zpracované působením ultrazvuku do konečných koncentrací 10 a 15 $\mu g/ml$. Pak se přidá 0,38 ml roztoku polyethylenglykolu o koncentraci 24 g/100ml (PEG 6000) v 0,4 M mannitolu s 30 mM chloridu hořečnatého a 0,1 g/100ml MES při pH 5,6 a roztok se opatrně promíchá. Pak se suspenze protoplastů přenesse do komůrky přístroje pro elektrické otevření pórů (Dialog^R) a užije se 10 pulsů s počátečním napětím 3250 V/cm a s exponen^cciálním rozpadem 10 μsec v intervalech 30 sec. Pak se vzorek vyjme a uloží

se do petriho misky s průměrem 10 cm. Pak se přidá ještě 10 ml prostředí KM-8p s obsahem 1,2 g/100 ml agarosy (Sea Plaque^R), protoplasty se rovnoměrně rozdělí v prostředí a agarosa se nechá ztuhnout.

B. Opakuje se postup podle příkladu 51A s tím rozdílem, že se užije počátečního napětí 3500 V/cm, 4 000 V/cm, 5 000 V/cm, 3 000 V/cm nebo 2 500 V/cm.

C. Opakuje se postup podle příkladů 51A a 51B s tím rozdílem, že se užije polyethylenglykol s molekulovou hmotností 4 000 nebo 8 000.

D. Opakuje se postup podle příkladů 51A, 51B nebo 51C s tím rozdílem, že se PEG přidává do konečné koncentrace 10 až 30 g/100 ml.

P ř í k l a d 52

Trasformace protoplastů *Dactylis glomerata* L. působením polyethylenglykolu (PEG)

A. Přímý přenos genu působením PEG se provádí způsobem podle svrchu uvedené publikace Negrotiu I. a další. Použitou DNA je linearizovaný plasmid, popsáný v příkladu 20.

Protoplasty se uvedou do suspenze po posledním promytí v 0,5 M mannitolu s obsahem 15 mM chloridu hořečnatého při množství protoplastů 2×10^6 v ml. Suspenze protoplastů se rozdělí po podílech 1 ml do zkumavek pro odstředivky s objemem 10 ml. Pak se přidá DNA způsobem, popsaným svrchu v příkladu 51 a pak se přidá 0,5 ml roztoku PEG (40 g/100 ml PEG 4 000 v 0,4 M mannitolu s 0,1 M dusičnanu vápenatého při pH 7,0). Roztoky se opatrně promísí a pak se inkubují 30 minut při teplotě místnosti přibližně 24° C cel^{ky} 30 minut za občasného protřepání. Pak se přidá 1,4 ml promývacího roztoku a roztok se opět opatrně promíchá. Promývací roztok obsahuje 87 mM mannitolu, 115 mM chloridu vápenatého, 27 mM chloridu hořečnatého, 39 mM chloridu draselného, 7 mM tris-pufu-HCl a 1,7 g/l myo-inositolu o pH 9,0. Pak se v intervalech 4 minuty přidají ještě 4 další podíly promývacího roztoku, po každém přidání se roztok promíchá. Pak se zkumavka odstřeďuje 10 minut při 60 g a supernatant se odloží. Pak se usazené protoplasty přenesou do 1 ml prostředí KM-8p a uloží do petriho misky s průměrem 10 cm. Pak se přidá ještě 10 ml prostředí KM-8p s obsahem 1,2 g/100 ml agarosy (SeaPlaque^R). Protoplasty se stejnoměrně rozdělí v prostředí a agarosa se nechá ztuhnout.

B. Opakuje se způsob podle příkladu 52A s jednou nebo větším počtem následujících modifikací:

- 1) roztok se upraví na pH 5,6 nebo 7,0 (promývací roztok),
- 2) užije se polyethylenglykol s molekulovou hmotností 6 000, 2 000 nebo 8 000,
- 3) promývací roztok sestává ze 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂, 5 mM chloridu draselného, 5 mM glukózy o pH 6,0, úprava se provádí KOH nebo 0,2 M CaCl₂, 0,1 g/100 ml MES, pH 6,0 se upraví KOH nebo 0,2 M CaCl₂, 7 mM Tris/HCl, pH 9,0, úprava se provádí KOH.

P ř í k l a d 53

Transformace Dactylis glomerata L. protoplastů otevřením pórů elektrickým proudem nebo působením PEG

Transformace se provádí způsobem podle příkladu 51 nebo 52 s tím rozdílem, že se protoplasty zpracovávají při teplotě 45°C po dobu 5 minut před rozdělením jednotlivých podílů do zkumavek pro transformaci nebo po rozdělení jednotlivých podílů před přidáním PEG.

P ř í k l a d 54

Selekce transformovaných kolonií

A. Plotny (petriho misky) s obsahem protoplastů z příkladů 51 až 53 se inkubují 10 dnů ve tmě při teplotě 25° C a pak se rozdělí na 5 stejných řezů pro další pěstování v pevném živném prostředí podle publikace Shillito R.D. a další, Plant Cell Reports 2, 244-247 (1983). Čtyři z uvedených řezů se pak uloží vždy do 20 ml živného prostředí SH-45 s obsahem 4 g/l hydrolyzátu kaseinu a 20 μ g/l hygromycinu B. Pátý řez se uloží do 20 ml téhož živného prostředí, avšak bez hygromycinu B, jde o kontrolní řez. Po 4 až 5 týdnech vytvořily transformované protoplasty kolonie na hygromycinu B. Tyto kolonie byly vyříznuty z agarozového gelu a uloženy do petriho misky s průměrem 19 mm s 2 ml, kapalného prostředí SH-45 s obsahem 20 μ g/l hygromycinu B směs byla protřepávána při 50 otáčkách za minutu na třepacím zařízení. Po dalších 4 až 5 týdnech byly všechny rostoucí kolonie přeneseny do Erlenmeyerových baněk a pěstovány obdobným způsobem jako v původní suspenzní kultuře s tím rozdílem, že prostředí obsahovalo 20 μ g/ml hygromycinu B.

Nové suspenze byly přenášeny do čerstvého živného prostředí vždy po 1 až 3 týdnech při použití živného prostředí SH-45 s obsahem 4 g/l hydrolyzátu kaseinu a 20 μ g/ml hygromycinu B. Buňky z těchto suspenzí byly také naneseny na pevné prostředí SH-45 s obsahem 20 μ g/ml hygromycinu B.

mycinu B a plotny se inkubují ve tmě při 25° C. Kalus, který se vyvine z buněk, pěstovaných na pevném živném prostředí se přenáší na čerstvé prostředí každé dva týdny. Buňky, které rostou za přítomnosti hygromycinu B jsou transformované buňky.

B. Selektce se provádí způsobem podle příkladu 54A s tím rozdílem, že kolonie, odvozené od protoplastů, rostoucích v prostředí s obsahem hygromycinu B se přenesou na agarové plotny s prostředím SH-30 s obsahem 20 µg/ml hygromycinu B a inkubují se ve tmě při teplotě 25°C.

P ř í k l a d 55

Regenerace transformovaných rostlin *Dactylis glomerata* L.

Kalus *Dactylis glomerata* L., získaný způsobem podle příkladu 54, odvozený od protoplastů se pěstuje na zpevněném prostředí SH-30 a každé dva týdny se přenáší do čerstvého prostředí. Embrya, která se oddělují a nanášejí na germinační prostředí (SH-0) a ukládají na světlo (45 až 55 µE/m² sec). Ke klíčení těchto embryí dochází po 1 až 4 týdnech a výsledné rostlinky se uloží do prostře-

dí SH-0 na světle k vytvoření kořenového systému. Pak se rostlinky přenesou do skleníku ve stadiu šesti až dvanácti lístků a postupně se otužují.

B. Kalus, získaný způsobem podle příkladu 54, odvozený od protoplastů se pěstuje na prostředí SH-0 po jeho zpevnění 0,24 g/100 ml prostředku Gelrite^R, na světle (45 až 55 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ sec}$) a přenášejí se do čerstvého prostředí každé dva týdny. Výsledné rostlinky se uloží do směsi prostředí SH-0 a OMS v poměru 1 : 1 a prostředí se zpevní přidáním 0,12 g/100 ml prostředku Gelrite^R a 0,4 g/100 ml agaru, rostlinky se pěstují na světle k vytvoření kořenového systému. Pak se ve stadiu šesti až dvanácti lístků přenesou do skleníku a postupně se otužují.

C. Malé rostlinky se získají způsobem podle příkladu 44A a 44B a uloží se do prostředí OMS, zpevněného 0,8 g/100 ml agaru, na světle k vytvoření kořenového systému. Pak se přenesou ve stadiu 6 až 12 lístků do skleníku a postupně se otužují.

D. Malé rostlinky se získají způsobem podle příkladu 44A a uloží se do směsi prostředí SH-0 a OMS v poměru 1 : 1, zpevněného přidáním 0,12 g/100 ml Gelrite^R a 0,4 g/100 ml agaru, na světle k vytvoření kořenového systému. Pak se přenesou do skleníku a otužují.

6. Přechodná exprese genu

V následujících příkladech je popsáno, jak je možno včlenit a využít chimérní geny, aniž by je bylo nutno nastálo zavést do genomu rostliny.

P ř í k l a d 56

Včlenění DNA do protoplastů N. Tabacum působením PEG

A. Příprava protoplastů N. tabacum se provádí postupy, které byly popsány v následujících publikacích: Paszkowski J. a další, EMBO J. 3, 2717 (1984), britský patentový spis č. 2 159 173, evropský patentový spis č. 129 668, Shillito R. D. a Potrykus I.: Methods in Enzymology, eds. Wu, R. and Grossman, L., Academic Press, Orlando, Florida, sv. 153, 313 - 306, /1987/ nebo jinými známými postupy.

B. DNA se zavádí do protoplastů modifikací postupu, který byl uveden v publikaci Negrutiu I. a další, Plant Mol. Biol. 8, 363 (1987). Protoplasty, připravené způsobem podle příkladu 56 A se po posledním

promytí znovu uvedou do suspenze v roztoku, který obsahuje 0,4 M mannitolu, 15 - 30 mM chloridu vápenatého, 0,1 g/100 ml MES při počtu protoplastů 1,6 až 2×10^6 /ml. Suspenze protoplastů se pak dělí po podílech 0,5 ml do zkumavek pro odstředivku z plastické hmoty s objemem 10 ml. DNA z příkladů 19 až 31 se smísí s 10 μ l sterilní destilované vody, sterilizuje se podle publikace Paszkowski J. a další, EMBO J., 3, 2717 : (1984) a pak se přidá 0,5 ml roztoku polyethylenglykolu s molekulovou hmotností 8000 a obsahem 40 g PEG/100 ml ve směsi 0,4 M mannitolu a 0,1M dusičnanu vápenatého o pH 7,0. Roztoky se opatrně promíchají a pak se inkubují 30 minut při teplotě místnosti přibližně 24 °C za občasného protřepávání. Pak se přidá 1 ml promývacího roztoku a obsah zkumavky se opatrně promíchá. Promývací roztok sestává z 154 mM chloridu sodného, 125 mM chloridu vápenatého, 5 mM chloridu draselného a 5 mM glukózy při pH 6,0, toto pH se upraví hydroxidem draselným. Pak se v intervalech 5 minut přidají další podíly 2 ml, 3 ml a 4 ml promývacího roztoku, přičemž po každém přidání se směs promíchá. Pak se zkumavka odstředí 10 minut při 10 až 100 g a supernatant se odloží. Usazenina protoplastů se smísí s dostatečným množstvím prostředí K3 s 0,3 M glukózy k úpravě osmotického tlaku, bez sacharózy, počet protoplastů má být 100 000/ml, dále se pěstují v Petriho misce s průměrem 10 cm.

C. Opakuje se příklad 56 B s tím rozdílem, že se uskuteční jedna nebo větší počet následujících modifikací:

- 1) pH promývacího roztoku se upraví na 5,6 nebo 7,0,
- 2) užije se PEG s molekulovou hmotností 4000,
- 3) užije se promývacího prostředí se složením 0,2 M chloridu vápenatého, 0,1 g/100 ml MES při pH 6,0 po úpravě hydroxidem draselným nebo se složením 0,2 M chloridu vápenatého, 7 mM Tris/HCl o pH 9,0 po úpravě hydroxidem draselným,
- 4) spolu s DNA plasmidu se přidá 50 µg DNA z telecího brzlíku ve 25 µl sterilní vody,
- 5) DNA plasmidu se před použitím linearizuje působením vhodného restrikčního enzymu, například BamHI.

P ř í k l a d 57

Včlenění DNA do protoplastů N. Tabacum otevřením pórů působením elektrického proudu

A. Včlenění DNA do protoplastů N. tabacum se provádí zpracováním protoplastů působením elektrického pulsu za přítomnosti příslušné DNA, jde o mo-

difikaci postupů, které byly popsány v publikacích Fromm M. E.: Methods in Enzymology, eds. Wu R. a Grossman L., Academic Press, Orlando, Florida, sv. 153, 307 (1987) a Shillito R. D a Potrykus I. tamtéž, str. 283 - 306.

Protoplasty se izolují způsobem podle příkladu 56 A. Pak se po posledním promytí znovu uvedou do suspenze v roztoku, který obsahuje 0,2 M mannitolu, 0,1 g/100 ml MES, 72 mM chloridu sodného, 70 mM chloridu vápenatého, 2,5 mM chloridu draselného a 2,5 mM glukózy při pH 5,8 po úpravě hydroxidem draselným, množství buněk je 1,6 až 2×10^6 /ml. Suspenze protoplastů se rozdělí po podílech 1 ml do plastických kyvet pro jedno použití a přidá se 10 μ g DNA jako v příkladech 56 B a C. Odpor roztoku v tomto okamžiku při měření mezi elektrodami zařízení pro otevření pórů elektrickým proudem je přibližně 6 ohmů.

DNA z příkladů 19 až 31 se smísí s 10 μ l sterilní destilované vody a sterilizuje se podle publikace Paszowski J. a další, EMBO J. 3, 2717 (1984). Roztok se opatrně promíchá a pak se při teplotě místnosti 24 až 28 °C podrobí pulsu s napětím 400 V/cm s rýznem v průběhu 10 ms ze zařízení pro elektrické otevření pórů (BTX-Transfector 300) při použití sestavy elektrod

471. Protoplasty se ponechají 5 minut a pak se uloží do Petriho misky s prostředím K3 způsobem podle příkladu 56 A, množství protoplastů je 100 000/ml.

B. Opakuje se postup podle příkladu 57 A s tím rozdílem, že se uskuteční jedna nebo větší počet následujících modifikací:

- 1) užije se napětí 200 V/cm nebo napětí v rozmezí 100 V/cm a 800 V/cm,
- 2) exponenciální rozpad je 5 ms, 15 ms nebo 20 ms,
- 3) spolu s DNA plasmidu se přidá 50 µg DNA z telecího brzlíku ve 25 µl sterilní vody,
- 4) DNA plasmidu se před použitím linearizuje působením vhodného restrikčního enzymu, například BamHI.

P ř í k l a d 58

Včlenění DNA do protoplastů Zea Mays, linie 2717

Protoplasty inbrední linie Funk 2717 kukuřice se připraví způsobem podle příkladů 40 až 47 a pak se znovu uvedou do suspenze v některém z roztoků,

pro resuspensi protoplastů *N. tabacum* v příkladech 56 a 57, množství buněk je 10^7 /ml. Transformace se provádí stejně jako v příkladech 56 a 57. Po transformaci se protoplasty pěstují při hustotě 2×10^6 /ml v prostředí KM-8p bez zpevňovacího materiálu, prostředí obsahuje 1 mg/l 2,4-D.

P ř í k l a d 59

Včlenění DNA do protoplastů *Sorghum bicolor*

Protoplasty *Sorghum* FS 562 v suspenzi se připraví stejně jako v případě *Zea mays* z příkladu 40 a pak se znovu uvedou do suspenze v některém z roztoků, které byly popsány pro protoplasty *N. tabacum* v příkladech 56 a 57, hustota buněk je 10^7 /ml. Transformace se provádí způsobem, popsaným v příkladu 58. Po uskutečněné transformaci se protoplasty pěstují při hustotě 2×10^6 /ml v prostředí KM-8p bez přidání zpevňovacího materiálu.

P ř í k l a d 60

Včlenění DNA do protoplastů *Nicotiana plumbaginifolia*,
Petunia hybrida a *Lolium multiflorum*

Protoplasty *N. plumbaginifolia*, *P. hybrida* nebo *L. multiflorum* se připraví způsobem podle svrchu uvedené publikace Shillito a Potrykus a pak se zpracovávají způsobem podle příkladů 56 a 57. Pak se pěstují v prostředí ze svrchu uvedené publikace bez přidání agarosu nebo jakéhokoliv jiného materiálu, vytvářejícího gel.

P ř í k l a d 61

Včlenění DNA do protoplastů *Glycine max*

Protoplasty *Glycine max* se připraví způsobem, popsaným v publikacích Tricoli D. M a další, *Plant Cell Reports*, 5, 334 - 337 (1986) nebo Chowbury V. K. a Widholm J. M., *Plant Cell Reports* 4, 289 - 292 (1985) nebo Klein A. S. a další, *Planta* 152, 105 - 114 (1981). DNA se do těchto protoplastů včlení způsobem podle příkladů 56 a 57. Pak se protoplasty dále pěstují způsobem,

popsaným v kterékoliv ze tří svrchu uvedených publikací bez přidání alginátu ke zpevnění prostředí.

7. Chemická regulace transgenické rostlinné tkáně

V následujících příkladech jsou popsány postupy pro chemickou regulaci chemicky regulovatelných genů v reprezentativních transgenických rostlinných tkáních. Následující příklady jsou zaměřeny na indukci, je však možno aplikovat také systémy, které jsou založeny na represí.

Pro působení chemického regulátoru na transgenické buňky je popsána celá řada postupů. Je například možno uvést buňky do suspenze v kapalném prostředí, které obsahuje regulátor. Kalus je možno pěstovat nebo přenést do prostředí s obsahem regulátoru nebo je možno regulátor nanést na kalus například sterilním štětečkem. Rostliny nebo části rostlin je možno zpracovat roztokem nebo suspenzí regulátoru štětečkem nebo s výhodou zařízením na zvlhčování rostlin.

Exprese fenotypického jevu v transgenických rostlinách s obsahem chemicky regulovatelného chimérního genu je úměrná množství regulátoru.

P ř í k l a d 62

Chemická indukce kultur transgenického kalu

A. Kalus, získaný svrchu uvedenými postupy se užije k popisům s chemickou indukcí, při nichž se nanese sterilním štětečkem nebo zvlhčovačem rostlin roztok 0,1 až 50 mM kyseliny salicylové, jehož pH bylo upraveno na 6,0 až 8,0 přidáním hydroxidu sodného, roztok se před použitím sterilizuje filtrací.

Po indukci se kalus inkubuje dva dny, načež se zmrazí v kapalném dusíku a skladuje při teplotě -80°C až do zkoušky na indukci genu, tak jak je popsáno v příkladu 65 a/nebo 66.

B. Pro indukci je možno užít také některých z následujících roztoků:

- 1) 0,1 až 50 mM kyseliny benzoové, pH bylo upraveno na 6,0 až 8,0 přidáním hydroxidu sodného,
- 2) 0,1 až 50 mM kyseliny polyakrylové, prostředí se upraví na pH 6,0 až 8,0 přidáním hydroxidu sodného,
- 3) roztok obsahuje methylbenzen 1,2,-thidiazol-7-karboxylát. Tento roztok se získá tak, že se znovu uvede do suspenze smáčivý prášek s obsahem uvedené látky

ve sterilní vodě na několik minut při koncentraci 1 mg/ml. Nerozpustný podíl se z roztoku odstraní současně se sterilizací filtrací,

- 4) roztok obsahuje 0,1 až 50 mM kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, pH 6,0 až 8,0. Sloučenina se rozpustí v co nejmenším množství dimethylsulfoxidu (DMSO), roztok se zředí sterilní vodou na požadovanou koncentraci. Získaná suspenze se užije bez filtrace.
- 5) 0,1 až 50 mM n-propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu, připraveného stejným způsobem jako v bodu 4).
- 6) 0,1 až 50 mM benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu, připraveného podle bodu 4).
- 7) 0,1 až 50 mM kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové ve formě N-sek-butylhydrazidu, roztok se připraví stejným způsobem jako v bodu 4).
- 8) 0,1 až 50 mM kyseliny 2,6-dichlorisonikotinové o pH 6,0 až 8,0, roztok se připraví podle bodu 4).
- 9) 0,1 až 50 mM methyl-2,6-dichlorisonikotinátu, roztok se připraví stejně jako v bodu 4).

P ř í k l a d 63

Chemická indukce v transgenických rostlinách

A. Exprese genů se indukuje v rostlinách, získaných podle svrchu uvedených postupů tak, že se rostliny jemně postříkají roztokem 0,1 až 50 mM kyseliny salicylové, upravením na pH 6,0 až 8,0 hydroxidem sodným, roztok se nanáší na list zvlhčovacím zařízením.

Rostlinky se nechají růst dva dny, pak se sklídí, zmrazí v kapalném dusíku a skladují při teplotě -80°C , načež se užijí k provádění stanovení podle příkladů 65 a/nebo 66.

B. Pro indukci je možno použít také některých z následujících roztoků:

- 1) 0,1 až 50 mM kyseliny benzoové po úpravě pH v rozmezí 6,0 až 8,0 přidáním hydroxidu sodného.
- 2) 0,1 až 50 mM kyseliny polyakrylové po úpravě pH na rozmezí 6,0 až 8,0 hydroxidem draselným.
- 3) Methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát. Roztok se získá tak, že se uvede do suspenze smáčivý prášek s obsahem uvedené látky ve sterilní vodě na několik minut při koncentraci 1 mg/ml. Nerozpustný podíl se odstraní současně se sterilizací filtrací.

- 4) 0,1 až 50 mM kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, pH je v rozmezí 6,0 až 8,0. Sloučení na se rozpustí v co nejmenším množství dimethylsulf-oxidu (DMSO), načež se roztok zředí sterilní vodou na požadovanou koncentraci. Získaná suspenze se uží-je bez filtrace.
- 5) 0,1 až 50 mM n-propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karbo-xylát, roztok se připraví jako v bodu 4).
- 6) 0,1 až 50 mM benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxy-látu, roztok se připraví jako v bodu 4).
- 7) 0,1 až 50 mM N-sek.butylhydrazidu kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, roztok se připraví stejným způsobem jako v bodu 4).
- 8) 0,1 až 50 mM kyseliny 2,6-dichlorisonikotinové o pH 6,0 až 8,0, roztok se připraví jako v bodu 4).
- 9) 0,1 až 50 mM methyl 2,6-dichlorisonikotinátu, roztok se připraví způsobem podle bodu 4).

P ř í k l a d 64

Indukce exprese včleněné DNA v protoplastech *N. tabacum*,
Zea mays, *N. plumbaginifolia*, *P. hybrida*, *L. multiflorum*
a *Sorghum bicolor*

A. Protoplasty, zpracované způsobem podle příkladů 56 až 61 se pěstují dva dny ve tmě při teplotě 26 °C. Po této době se přidá kyselina salicylová v koncentraci 0,1 až 50 mM ve formě neutralizovaného roztoku s pH v rozmezí 6,0 až 8,0. Pak se protoplasty pěstují další dva dny, oddělí se odstředěním, rychle se zmrazí a provádí se zkoušky, popsané v následujících příkladech.

B. Je také možno postupovat tak, že se k protoplastům přidají do konečné koncentrace 0,1 až 50 mM neutralizovaného roztoku nebo suspenze následujících sloučenin:

- 1) kyselina benzoová,
- 2) kyselina polyakrylová,
- 3) methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát,
- 4) kyselina benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylová,
- 5) n-propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxalát,
- 6) benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát,
- 7) N-sek-butylhydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové,
- 8) kyselina 2,6-dichlorisonikotinová,
- 9) methyl 2,6-dichlorisonikotinát.

C. Indukci je možno provádět také jako v příkladech 64 A a B s tím rozdílem, že se před indukcí protoplasty pěstují jeden den, tři dny nebo pět dnů.

D. Indukce se provádí obdobným způsobem jako v příkladech 64 A, B nebo C s tím rozdílem, že se protoplasty po indukci před izolací pěstují ještě jeden den, tři dny nebo pět dnů.

P ř í k l a d 65

Zkoušky na chemicky indukovatelné řetězce DNA a produkce mRNA

Rostlinné materiály se podrobí indukci a izolují se jako v příkladech 62 až 64 a pak se sledují na indukci typů mRNA izolací této RNA s následujícím prodloužením pomocí primeru způsobem, který byl popsán v příkladu 5.

Kalus nebo regenerovaný rostlinný materiál, odebraný z transgenických rostlin, obsahujících chemicky regulovatelný chimérní gen, který je kódem pro GUS, AHAS nebo BT obsahuje po indukci působením

kyseliny salicylové, methylbenzo-1,2,3-benzothiadiazol-7-karboxylátu, kyseliny benzo 1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, n-propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu, benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu, N-sek-butylhydrazidu kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, kyseliny 2,6-dichlorisonikotinové, methyl 2,6-dichlorisonikotinátu nebo TMV zvýšenou hladinu mRNA po zkouškách při použití primeru, zejména při prodloužení působení primeru. Úroveň této mRNA je úměrná množství použitého chemického regulátoru.

P ř í k l a d 66

Zkouška na chemicky indukovatelný řetěec DNA: enzymatická účinnost β -glukuronidázy

A. Zkouška ELISA

Zmrazené listy se rozdrtí v třecí misce při použití tlouku za přítomnosti kapalného dusíku za vzniku jemného prášku. Extrakty listové tkáně se připraví tak, že se smísí udané množství listu v gramech s určitým objemem v ml extrakčního pufru pro GUS podle publikace Jefferson R. A. a další, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 83, 8447 - 8451 (1986). Tento pufr obsahuje 50 mM fosforečnanu sodného o pH 7,0, 0,1 % Tritonu-X 100, 0,1 % sarkosylu a 10 mM β -merkapt ethanolu.

Reakce se provádí ve vyhloubených desek ELISA tak, že se smísí 5 až 25 μ l extraktu se 120 až 100 μ l pufru pro GUS, který obsahuje 50 mM fosforečnanu sodného o pH 7,0, 0,1 % Tritonu X-100 a 10 mM β -merkapt ethanolu, mimoto se přidá 4-methylumbelliferylglukuronid (MU) do konečné koncentrace 2 mM, celkový objem je 125 μ l. Desky se pak inkubují 1 až 5 hodin při teplotě 37 °C a pak se reakce zastaví přidáním 150 μ l 3M uhličitanu sodného. Koncentrace uvolněného fluorescenčního indikátoru se stanoví odečtením na příslušném zařízení (Flow Labs Fluoroskan II ELISA plate reader).

B. Výsledky uvedených pokusů jsou shrnuty v následující tabulce II.

T a b u l k a II

Specifická účinnost nKat MU/mg bílkoviny

rostlina ^a	A	B	C	D	E ^b
H 1	5,39 ± 1,9	13,9 ± 1,2	13,5 ± 0,8	20,1 ± 5,1	33,6 ± 2,6
H 3	0,21 ± 0,02	6,92 ± 0,88	11,95 ± 0,85	1,66 ± 0,02	6,54 ± 1,43
H4	8,39 ± 1,31	27,5 ± 0,7	18,52 ± 1,07	2,28 ± 0,78	25,1 ± 0,9
H6	0,10 ± 0,04	4,08 ± 0,58	2,58 ± 0,01	0,09 ± 0,06	2,8 ± 1,2
H9	0,23	10,8	9,1	0,5	7,5
Alu 1	5,6	20,0	206,9	20,5	70,5
Alu 2	2,0	6,6	83,2	8,9	155,3
Alu 3	0,1 ± 0,07	2,8 ± 0,9	2,0 ± 0,9	2,0 ± 0,5	5,8 ± 3,8
Alu 4	2,1 ± 1	43,0 ± 19	7,1 ± 2,6	6,1 ± 3,2	7,5 ± 3,5
Alu 5	0,6 ± 0,2	4,4 ± 2,3	1,2 ± 0,6	0,5 ± 0,3	8,3 ± 3,7

Tabulka II - pokračování

rostlina ^a	A	B	C	D	E ^b
Alu 6	0,8	28,8	67,0	3,1	36,4
Alu 7	1,7	38,7	29,1	21,7	63,0
Alu 8	0,6	0,4	0,4	0,6	0,2
Alu 9	0,9	0,6	0,4	0,3	nd
Alu 10	4,0	39,2	52,0	8,1	37,9
Alu 11	1,6 ± 0,8	1,9 ± 0,9	2,8 ± 1,3	2,2 ± 2,6	2,8 ± 2,9
Alu 12	0,7 ± 0,4	57,1 ± 22	73,4	2,3 ± 1,2	78,0 ± 41,4
Alu 13	0,1	19,1	13,2	1,9	10,6
Hae 1	0,6	1,6	2,6	1,7	3,9
Hae 2	2,3	8,8	11,8	0,4	0,8
Hae 3	1,7	11,1	11,2	3,0	1,6
Hae 4	2,0	8,1	10,8	1,7	0,82
Hae 5	18,1	59,4	132,5	36,6	14,0
Hae 8	0,4	30,6	28,9	0,6	29,0
Hae 9	2,6	63,9	129,7	12,5	55,2

Tabulka II - pokračování

rostlina ^a	A	B	C	D	E ^b
Hae 10	1,6	70,5	98,2	13,5	94,5
Hae 11	2,6	81,8	58,5	3,9	46,0
Hae 12	0,2	2,5	5,8	0,6	14,5
Hae 13	0,01	0,7	0,1	nd	nd
Hae 14	0,1	1,8	8,6	0,1	3,3
Hae 15	0,1	6,4	7,2	3,4	7,4
Hae 16	0,1	2,3	4,3	0,8	2,7

^a H 1-9 jsou rostliny tabáku získané transformací disku z listů kmenem CIB271,

Alu 1-13 jsou rostliny tabáku, získané transformací disku z listů kmenem CIB272,

Hae 1-16 jsou rostliny tabáku, získané transformací disku z listů kmenem CIB273.

^b A = voda, B = kyselina salicylová, C = methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát,

D = pufr, E = TMV

Transformovaný kalus tabáku (příklad 23): pro vzorky transformovaného kalu, izolované 21 hodin po zpracování byly získány následující hodnoty GUS: transformace CIB271: postřik vodou: 1,8 nKat MU/mg bílkoviny; 50 mM salicylát sodný, postřik: 3,8 nKat MU/mg bílkoviny. Transformace CIB271 (jiný pokus): postřik vodou: 2,8 nKat MU/mg bílkoviny; postřik methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátem v množství 250 µg/l: 13,7 nKat MU/mg bílkoviny. Transformace CIB273: postřik vodou: 0,46 nKat MU/mg bílkoviny; postřik methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátem v koncentraci 250 µg/l: 31,2 nKat MU/mg bílkoviny.

Transformovaná karotka (příklad 36): následující hodnoty GUS byly získány ze vzorků kalu, transformovaného plasmidem pCIB271 po jeho izolaci 21 hodin po transformaci. Postřik vodou: 5,2 pKat MU/mg bílkoviny. 50 mM salicylát sodný ve formě postřiku: 11,6 pKat MU/mg bílkoviny. 250 µg/l methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát ve formě postřiku: 22,1 pKat MU/mg bílkoviny.

Transformované rajče (příklad 38): následující hodnoty GUS byly získány ze vzorků transformovaného kalu, který byl izolován 21 hodin po zpracování. Transformace CIB271: postřik vodou: 17,2 pKat

MU/mg bílkoviny; 250,ug/l methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu ve formě postřiku: 56,1 pKat MU/mg bílkoviny. Transformace CIB273 x A4: postřik vodou: 4,6 pKat MU/mg bílkoviny; 250,ug/l methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát ve formě postřiku: 22,1 pKat MU/mg bílkoviny.

Přechodná exprese v protoplastech tabáku /příklad 56/ po působení pCIB269: postřik vodou: $30,6 \pm 13$ pKat MU/mg bílkoviny; methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát: $66,6 \pm 20$ pKat MU/mg bílkoviny.

P ř í k l a d 67

Sledování chemické indukce endogenního genu

V kontrolním pokusu se materiály, odebrané z tabákových rostlinek po indukci způsobem podle příkladů 62 až 64 působením kyseliny salicylové, methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu a TMV sledují na transkripci mRNA z endogenního genu PR-1a způsobem, popsaným v příkladu 5. Po indukci všemi třemi chemickými regulátory je možno prokázat zvýšené hladiny mRNA.

P ř í k l a d 68

Stanovení chemicky indukovatelných řetězců DNA:
enzymatická účinnost syntetázy acetoxykyseliny (AHAS)

A. Příprava vzorků pro stanovení AHAS

Stanoví se hmotnost tkáně z listů a/nebo z kořenů, v níž má být stanovení prováděno, tkáň se uloží do kapalného dusíku a rozdrtí na jemný prášek. Pak se ke tkáni přidá jeden objem (v ml) chladného homogenizačního pufru, sestávajícího z 50 mM dihydrogenfosforečnanu sodného o pH 7,0, 0,5 mM EDTA o pH 7,0, 0,5 mM chloridu hořečnatého, 1 mM pyrohroznanu sodného o pH 7,0, 10 μ M flavinadenindinukleotidu, 1 mM fenylmethylsulfonylfluoridu, 10 % glycerolu, objem prostředí je roven v ml dvojnásobku hmotnosti tkáně v gramech a směs se přenese do tlakové komory (French). Všechny další stupně se provádějí tak, že se zpracováváný materiál udržuje na teplotu 4 °C. Buňky se rozruší při tlaku 112 MPa, kapalným materiálem z buněk se izoluje do nádobky, uložené v ledu. Tkáň je také možno rozdrtit v homogenizačním pufru. Kapalným materiálem se 5 minut odstřeďuje při 10 000 ot/min k usazení buněčné drti. Objem supernatantu se měří a pak

se přidá do nasycení na 25 % síran amonný, v čistotě, odpovídající enzymatickým reakcím (144 mg síranu amonného/ml supernatantu). Směs se míchá v ledu 15 minut a pak se odstředí 5 minut při 10 000 ot/min. Usazenina se odloží a supernatant se upraví do 50% nasycení síranem amonným (158 mg síranu amonného/ml supernatantu). Po míchání 15 minut v ledu se usazenina oddělí odstředováním 5 minut při 10 000 ot/min. Získaná usazenina se rozpustí v 1 ml pufru pro nanesení na chromatografický sloupec na každé 2 g materiálu z listů nebo na 5 g materiálu z kořenů. Extrakt se zbaví solí nanesením na sloupec s náplní Sephadex G50 v rovnovážném stavu v pufru, který obsahuje 50 mM dihydrogenfosforečnanu sodného o pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM chloridu hořečnatého, 10 μ M flavinadenindinukleotidu, 1 mM fenylmethylsulfonylfluoridu a 10 % glycerolu. Vzorek se vymývá tímtož puftrem, odebírájí se vzorky, a to frakce po 2 ml na každý ml vzorku, naneseného na sloupec.

B. Zkouška ve zkumavce

5 - 50 μ l extraktu, připraveného podle příkladu 68 A se rozpustí v celkovém objemu 0,5 ml reakční směsi, která obsahuje 20 mM dihydrogenfosforečnanu sodného o pH 7,0, 20 mM pyrohroznanu sodného o pH 7,0, 0,5 mM thiaminpyrofosfátu, 5 mM chloridu hořeč-

natého, 10 mM flavinadenindinukleotidu. Směs se inkubuje 30 minut při teplotě 37 °C. Reakce se zastaví přidáním 50 µl 6N kyseliny sírové. Směs se inkubuje 15 minut při teplotě 60 °C, načež se přidá 625 µl reakčního činidla s α-naftolem, sestávajícího z 50 µl 5% α-naftolu ve 2,5 M hydroxidu sodném a 125 µl 25 mg/ml kreatinu a směs se inkubuje ještě 15 minut při teplotě 60 °C. V případě, že se vytvoří sraženina, je nutno ji odstranit odstředěním, pak se měří absorpce při 520 nm. Pak se vypočítají pikomoly vytvořeného acetoinu ze standardní křivky, která se získá použitím 0,4 až 10 µg acetoinu. Specifická aktivita se vypočítá jako pKat/mg bílkoviny.

C. Zkouška na plotnách ELISA

1 až 20 µl vzorku se uloží do vykloubení desek, celkový objem reakční směsi je 0,15 ml. Směs se nechá reagovat 30 minut při teplotě 37 °C. Pak se reakce zastaví přidáním 50 µl 2,4 M kyseliny sírové s obsahem 1 % kreatinu. Směs se inkubuje 30 minut při teplotě 60 °C. Jakákoliv sraženina se oddělí odstředěním. Pak se 150 µl reakční směsi přenesse na novou plotnu, přidá se 100 µl 10% α-naftolu v 5M NaOH a směs se inkubuje ještě 20 minut při 60 °C, absorpce se měří při 520 nm, specifická aktivita se vyjádří jako v příkladu 68B.

P ř í k l a d 69

Stanovení chemicky indukovatelného řetězce DNA:
endotoxin Bacillus thuringiensis

A. Extrakce rostlinného materiálu

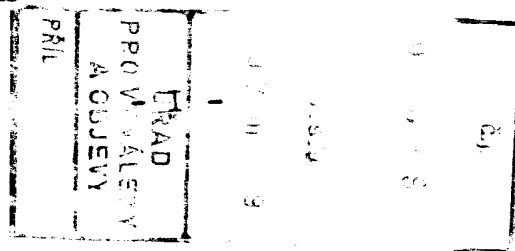
Přibližně 100 mg rostlinné tkáně se homogenizuje v 0,1 ml extrakčního pufru, který obsahuje 50 mM uhličitanu sodného o pH 9,5, 10 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100, 0,05 % Tween, 100 mM chloridu sodného, 1 mM fenylmethylsulfonylfluoridu (přidá se těsně před použitím) a 1 mM leupeptinu (přidá se těsně před použitím). Po extrakci se přidá 2 M tris-pufu o pH 7,0 k úpravě pH na 8,0 až 8,5. Pak se extrakt 10 minut odstřeďuje v mikrocstředivce (Beckman) a supernatant se užije pro analýzu ELISA.

B. Analýza ELISA

Plotná ELISA se předem zpracuje působením ethanolu. Afinitním způsobem čištěné králičí antiserum proti Bt v množství 50 μ l a koncentraci 3 μ g/ml v chloridu sodném s boritanovým pufrem, který obsahuje 100 mM kyseliny borité, 25 mM boritanu sodného, 75 mM

chloridu sodného o pH 8,4 až 8,5 se přidá do jednotlivých vyhloubení plotny a plotna se inkubuje přes noc při teplotě 4 °C. Antiserum se získá tak, že se králíci imunizují čištěným Bt (endotoxin *Bacillus thuringiensis*) v krystalické formě ve zvyšujícím se množství podle publikace Ang B. J. a Nickerson K. W., Appl. Environ. Microbiol. 36, 625 - 626 (1978), solubilizovaným dodecylsírany sodným. Deska se pak omyje pufrům, který obsahuje 10 mM tris-HCl o pH 8,0, 0,05 % Tween 20 a 0,02 % azidu sodíku, pak se 1 hodinu působí při teplotě místnosti blokujícím pufrům, který obsahuje 10 mM fosforečnanu sodného o pH 7,4, 140 mM chloridu sodného, 1 % serového albuminu skotu a 0,02 % azidu sodíku, načež se deska znovu omyje. Přidá se rostlinný extrakt v takovém množství, aby obsahoval 50 µg bílkoviny (typicky 5 µl extraktu, bílkovina se stanoví způsobem podle publikace Bradford M., Anal. Biochem. 72, 248 (1976) při použití komerčně dodávané sestavy (Bio-Rad), a pak se deska inkubuje přes noc při teplotě 4 °C. Po omytí se přidá 50 µl afinitní chromatografií čištěného kozího antisera proti Bt v koncentraci 3 µg/ml bílkoviny v ředidle pro zkoušku ELISA, které sestává z 10 mM fosforečnanu sodného o pH 7,4, 140 mM chloridu sodného, 0,05 % Tween 20, 1 % serového albuminu skotu a 0,02 % azidu sodíku, načež se deska nechá inkubovat 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po omytí se přidá

50 μ l králíčích protilátek proti kozímu antigenu, protilátka je vázána na alkalickou fosfatázu (Sigma Chemicals, St. Louis, Mo., USA) a zředěná v poměru 1 : 500 v ředidle pro zkoušku ELISA, materiál se inkubuje 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po omytí se přidá 50 μ l substrátu (0,6 mg/ml p-nitrofenylfosfátu, 0,05 mg/ml chloridu hořečnatého, 10 % diethanoaminu, o pH 9,8 po úpravě kyselinou chlorovodíkovou a materiál se inkubuje ještě 30 minut při teplotě místnosti. Reakce se ukončí přidáním 50 μ l 3M hydroxidu sodného. Absorpce se odečítá při 405 nm v modifikovaném přístroji ELISA (Hewlett Packard, Stanford, Ca., USA).



PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Nekódový řetězec DNA, schopný regulace transkripce sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž tato regulace je závislá na chemickém regulátoru.
2. V podstatě čistý nekódový řetězec DNA podle bodu 1.
3. Řetězec DNA podle bodu 2, vyznačující se tím, že sdruženým řetězcem DNA je kódový řetězec.
4. Řetězec DNA podle bodu 2, vyznačující se tím, že regulace je závislá na chemickém regulátoru pro indukci.
5. V podstatě čistý řetězec DNA podle bodu 1, vyznačující se tím, že je nebo že má podstatnou homologii s nekódovým, chemicky regulovatelným řetězcem DNA, který je součástí přírodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu.

6. Řetězec DNA podle bodu 5, vyznačující se tím, že je schopný regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž sdruženým řetězcem DNA je kódový řetězec.

7. Řetězec DNA podle bodu 6, vyznačující se tím, že transkripce je regulována chemickým regulátorem pro indukci.

8. Řetězec DNA podle bodu 5, vyznačující se tím, že chemicky regulovatelným genem je gen pro bílkovinu PR.

9. Řetězec DNA podle bodu 8, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-1', PR-Q nebo PR-R tabáku, gen pro chitinázu z okurky nebo gen pro zásaditou nebo kyselou β -1,3-glukanázu z tabáku.

10. Řetězec DNA podle bodu 8, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-1' nebo PR-R tabáku nebo gen pro chitinázu z okurky.

11. Řetězec DNA podle bodu 8, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen PR-la z tabáku.

12. Řetězec DNA podle bodu 8, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen PR-1' z tabáku.

13. Řetězec DNA podle bodu 8, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen pro zásaditou β -1,3-glukanázu z tabáku.

14. Řetězec DNA podle bodu 8, vyznačující se tím, že je uložen v 5'-oblasti uvedeného genu pro bílkovinu PR.

15. Řetězec DNA podle bodu 6, vyznačující se tím, že transkripce je regulována chemickým regulátorem, který se volí ze skupiny: kyselina benzoová, kyselina salicylová, kyselina acetylosalicylová, kyselina polyakrylová a substituční deriváty těchto látek.

16. Řetězec DNA podle bodu 6, vyznačující se tím, že transkripce je regulována chemickým regulátorem, který se volí ze skupiny: kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylová, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolthiokarboxylová, kyanobenzo-1,2,3-thiadiazol,

amid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové, hydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové a deriváty těchto látek.

17. Řetězec DNA podle bodu 6, vyznačující se tím, že transkripce je regulována působením methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu.

18. Řetězec DNA podle bodu 6, vyznačující se tím, že transkripce je regulována kyselinou dichlorisonikotinovou nebo jejím derivátem.

19. Řetězec DNA, který sestává z první složky řetězce, kterou je, nebo která má podstatnou homologii s nekódovým, chemicky regulovatelným řetězcem DNA z přírodně se vyskytujícího chemicky regulovatelného genu, přičemž tato první složka řetězce je schopna regulace transkripce sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni a tato regulace je závislá na chemickém regulátoru a z druhé složky řetězce DNA, kterou je nebo která má podstatnou homologii s částí, avšak nikoliv s úplným řetězcem transkribovatelné DNA, s níž je první složka sdružena v přírodně se vyskytujícím chemicky regulovatelném genu.

20. V podstatě čistý řetězec DNA podle bodu 19.

21. Řetězec DNA podle bodu 20, vyznačující se tím, že přírodně se vyskytující chemicky regulovatelný gen se vyskytuje v rostlině a druhou složkou řetězce DNA je kódový řetězec.

22. Řetězec DNA podle bodu 21, vyznačující se tím, že uvedeným genem je gen pro bílkovinu PR.

23. Řetězec DNA podle bodu 21, vyznačující se tím, že uvedený kódový řetězec je kódem pro signální peptid.

24. Chimérní řetězec DNA, sestávající z první, nekódové, chemicky regulovatelné složky řetězce DNA, která je schopna regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni, přičemž tato regulace je závislá na chemickém regulátoru a z druhé složky řetězce DNA, která je schopna transkripce v rostlině nebo v rostlinné tkáni.

25. Chimérní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že druhá složka řetězce DNA je

schopna regulovat expresi fenotypického jevu protismyslným mechanismem.

26. Chimérní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že druhou složkou řetězce DNA je kódový řetězec, schopný transkripce a translace za vzniku polypeptidu, v jehož důsledku vzniká fenotypický jev.

27. Chimérní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že druhá složka řetězce DNA je uložena v těsné blízkosti první složky řetězce.

28. Chimérní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že první složka řetězce DNA je regulována chemickým regulátorem pro represí.

29. Chimérní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že první složka řetězce DNA je regulována chemickým regulátorem pro indukci.

30. Chimérní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že první složka řetězce DNA je, nebo má podstatnou homologii s chemicky regulovatelným řetězcem DNA v přírodně se vyskytujícím chemicky regulovatelném genu z rostliny.

31. Chiménní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že první složka řetězce DNA je nebo má podstatnou homologii řetězce s chemicky regulovatelným řetězcem DNA v přírodně se vyskytujícím, chemicky regulovatelném genu z rostliny a druhou složkou řetězce DNA je kódový řetězec, který je schopen transkripce a translace za vzniku polypeptidu, v důsledku jehož přítomnosti vzniká fenotypický jev.

32. Chiménní řetězec DNA podle bodu 31, vyznačující se tím, že se druhá složka řetězce DNA nachází v těsné blízkosti první složky řetězce DNA.

33. Chiménní řetězec DNA podle bodu 31, vyznačující se tím, že první složka řetězce DNA je regulována chemickým regulátorem pro indukci.

34. Chiménní řetězec DNA podle bodu 31, vyznačující se tím, že první složka řetězce DNA je nebo má podstatnou homologii s chemicky indukovatelným řetězcem DNA v genu pro bílkovinu PR.

35. Chiménní řetězec DNA podle bodu 34, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen PR-1a, PR-1b, PR-1c, PR-1', PR-Q nebo PR-R z tabáku, gen

pro chitinázu z okurky nebo gen pro zásaditou nebo kyselou β -1,3-glukanázu z tabáku.

36. Chimérní řetězec DNA podle bodu 34, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen PR-1a, PR-1b- PR-1c, PR-1' nebo PR-R z tabáku nebo gen pro chitinázu z okurky.

37. Chimérní řetězec DNA podle bodu 34, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen PR-1a nebo PR-1' z tabáku.

38. Chimérní řetězec DNA podle bodu 34, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen pro zásaditou β -1,3-glukanázu v tabáku.

39. Chimérní řetězec DNA podle bodu 31, vyznačující se tím, že první složkou řetězce DNA je řetězec z 5'-oblasti genu PR-1a tabáku a obsahuje 300 nebo větší počet párů bazí od počátku transkripce.

40. Chimérní řetězec DNA podle bodu 39, vyznačující se tím, že první složka řetězce DNA obsahuje 600 až 1000 párů bazí v bezprostřední blízkosti počátku transkripce.

41. Chimévní řetězec DNA podle bodu 31, vyznačující se tím, že druhá složka řetězce DNA je kódem pro fenotypický jev.

42. Chimévní řetězec DNA podle bodu 41, vyznačující se tím, že se uvedený fenotypický jev volí ze skupiny tolerance nebo odolnosti proti herbicidům, houbám, virům, bakteriím, hmyzu, nematodům nebo pavoukovitým, produkce sekundárních metabolitů, samčí nebo samičí sterility a produkce enzymu nebo jiné látky."

43. Chimévní řetězec DNA podle bodu 41, vyznačující se tím, že uvedeným fenotypickým jevem je tolerance nebo resistance proti herbicidům nebo odolnost proti hmyzu.

44. Chimévní řetězec DNA podle bodu 43. vyznačující se tím, že tolerance nebo odolnost proti herbicidům je vyvolána řetězcem DNA, který je kódem pro divoký typ nebo pro syntetázu acetoxykyseliny, odolné proti herbicidům (AHAS).

45. Chimévní řetězec DNA podle bodu 43, vyznačující se tím, že odolnost proti hmyzu je vyvolána řetězcem DNA, který je kódem pro endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

46. Chimévní řetězec DNA podle bodu 41, vyznačující se tím, že fenotypickým jevem je vznik sloučeniny ze skupiny luciferáza (LUX), chloramfenicol-acetyltransferáza (CAT), neomycinfosfotransferáza (NPT), nopalinsyntetáza (NOS), octopinsyntetáza (OCS), β -1,3-glukuronidáza (GUS), syntetáza acetohydroxykyseliny (AHAS) a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

47. Chimévní řetězec DNA podle bodu 41, vyznačující se tím, že fenotypickým jevem je vznik sloučeniny ze skupiny β -1,3-glukuronidáza (GUS), syntetáza acetohydroxykyseliny (AHAS) a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

48. Chimévní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že první složka řetězce DNA je regulována chemickým regulátorem pro indukci genu pro bílkovinu PR v rostlinách.

49. Chimévní řetězec DNA podle bodu 48, vyznačující se tím, že se chemický regulátor volí ze skupiny kyselina benzoová, kyselina salicylová, kyselina acetylosalicylová, kyselina polyakrylová a substituční deriváty těchto sloučenin.

50. Chiménní řetězec DNA podle bodu 48, vyznačující se tím, že chemický regulátor se volí ze skupiny kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylová, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolthiokarboxylová, kyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, amid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové, hydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové a deriváty těchto látek.

51. Chiménní řetězec DNA podle bodu 48, vyznačující se tím, že se chemický regulátor volí ze skupiny kyselina benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylová, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazol-7-thiokarboxylová, 7-kyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylová, amid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, hydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové a deriváty těchto látek.

52. Chiménní řetězec DNA podle bodu 48, vyznačující se tím, že se chemický regulátor volí ze skupiny kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylová, alkylbenzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylát, v němž alkylový zbytek obsahuje 1 až 6 atomů uhlíku a deriváty těchto látek.

53. Chiménní řetězec DNA podle bodu 48, vyznačující se tím, že chemickým regulátorem je kyselina dichlorisonikotinová a její deriváty.

54. Chiménní řetězec DNA podle bodu 48, vyznačující se tím, že se chemický regulátor volí ze skupiny kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu, n-propylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu, benzylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylátu, sek.butylhydrazidu kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylové, kyseliny 2,6-dichlorisonikotinové a methyl-2,6-dichlorisonikotinátu.

55. Chiménní řetězec DNA podle bodu 48, vyznačující se tím, že chemickým regulátorem je methylbenzo-1,2,3-thiadiazol-7-karboxylát.

56. Chiménní řetězec DNA podle bodu 24, vyznačující se tím, že obsahuje první složku řetězce DNA, kterou je nebo která má podstatnou homologii s nekódovým, chemicky regulovatelným řetězcem DNA z přírodně se vyskytujícího, chemicky regulovatelného genu, přičemž tato první složka řetězce je schopna regulace transkripce sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo v rostlinné tkáni a tato regulace je závislá na chemickém regulátoru, druhou složku řetězce DNA, kterou je nebo která má podstatnou homologii s částí, avšak nikoliv s celým řetězcem transkribovatelné DNA, s níž je první složka sdružena v přírodně se vyskytujícím, chemicky regulovatelném genu a třetí složku řetězce DNA, která je schopna trans-

kripce v rostlině nebo v rostlinné tkáni.

57. Chimérní řetězec DNA podle bodu 56, vyznačující se tím, že první složkou řetězce je nebo první složka řetězce má podstatnou homologii s chemicky indukovatelným řetězcem DNA v genu pro bílkovinu PR.

58. Chimérní řetězec DNA podle bodu 56, vyznačující se tím, že druhá složka řetězce DNA je kódem pro signální peptid.

59. Chimérní řetězec DNA podle bodu 58, vyznačující se tím, že druhá složka řetězce DNA je kódem pro peptid, kterým je nebo který má podstatnou homologii se signálním peptidem genu pro bílkovinu PR.

60. Chimérní řetězec DNA podle bodu 59, vyznačující se tím, že genem pro bílkovinu PR je gen PR-1a.

61. Chimérní řetězec DNA podle bodu 56, vyznačující se tím, že třetí složka řetězce DNA je kódem pro fenotypický jev.

62. Vektor, obsahující nekódový řetězec DNA podle bodu 1.

63. Vektor podle bodu 62, vyznačující se tím, že obsahuje chimérní řetězec DNA podle bodu 24.

64. Vektor podle bodu 62, vyznačující se tím, že je funkční v rostlinných buňkách nebo v *Agromacterium*.

65. *E. coli* HB101/pTJS75-Km, ATCC č. 67628, uložený 12. února 1988 podle bodu 62.

66. Plasmid pBS-PR1013Cla, ATCC č. 40426, uložený 12. února 1988 podle bodu 62.

67. Plasmid pBS-PR1019, ATCC č. 40427, uložený 12. února 1988 podle bodu 62.

68. Plasmid pBS-Gluc39.1, ATCC č. 40526, uložený 29. prosince 1988 podle bodu 62.

69. Plasmid pBS-Gluc39.3, ATCC č. 40527, uložený 29. prosince 1988 podle bodu 62.

70. Plasmid pBS-cucchi/chitinase, ATCC č. 40528 uložený 29. prosince 1988 podle bodu 62.

71. Plasmid pBSGL6e, ATCC č. 40535, uložený 18. ledna 1989 podle bodu 62.

72. Rostlinná tkáň, rostlina nebo semena s obsahem chimérického řetězce DNA podle bodu 24.

73. V podstatě čistý signální peptid s řetězcem aminokyselin

MetGlyPheValLeuPheSerGlnLeuProSerPheLeuLeuVal-

SerThrLeuLeuPheLeuValIleSerHisSerCysArgAla

nebo peptid, který má podstatnou homologii řetězce s tímto peptidem.

74. Řetězec DNA, který je kódem pro signální peptid podle bodu 73 nebo pro peptid, který má podstatnou homologii řetězce s uvedeným peptidem.

75. V podstatě čistý řetězec DNA podle bodu 19, vyznačující se tím, že má složení, znázorněné jako "řetězec 1" nebo má podstatnou homologii řetězce s řetězcem, který je znázorněn jako "řetězec 1".

76. V podstatě čistý řetězec DNA podle bodu 19, vyznačující se tím, že má složení, znázorněné jako "řetězec 2" nebo má podstatnou homologii řetězce s řetězcem, který je znázorněn jako "řetězec 2".

77. V podstatě čistý řetězec DNA, vyznačující se tím, že má složení, znázorněné jako "řetězec 3" nebo má podstatnou homologii řetězce s řetězcem, který je znázorněn jako "řetězec 3".

78. V podstatě čistý řetězec DNA, vyznačující se tím, že má složení, znázorněné jako "řetězec 4" nebo má podstatnou homologii řetězce s řetězcem, který je znázorněn jako "řetězec 4".

79. V podstatě čistý řetězec DNA podle bodu 19, vyznačující se tím, že má složení, znázorněné jako "řetězec 5" nebo má podstatnou homologii řetězce s řetězcem, který je znázorněn jako "řetězec 5".

80. V podstatě čistý řetězec DNA podle bodu 19, vyznačující se tím, že má složení, znázorněné jako "řetězec 6" nebo má podstatnou homologii řetězce s řetězcem, který je znázorněn jako "řetězec 6".

81. V podstatě čistý řetězec DNA, vyznačující se tím, že má složení, znázorněné jako "řetězec 7" nebo má podstatnou homologii řetězce s řetězcem, který je znázorněn jako "řetězec 7".

82. V podstatě čistý řetězec DNA, vyznačující se tím, že má složení, znázorněné jako "řetězec 8" nebo má podstatnou homologii řetězce s řetězcem, znázorněným jako "řetězec 8".

83. Způsob výroby v podstatě čistého, chemicky regulovatelného řetězce DNA z chemicky regulovatelného genu v přírodně se vyskytujícím systému, který tento gen obsahuje, vyznačující se tím, že se

- a) aktivuje exprese RNA z chemicky regulovatelného genu v uvedeném systému,
- b) uvedená DNA se izoluje,
- c) podrobí se diferenciálnímu sledování sestava genomu pro RNA, získanou z RNA, izolované z uvedeného aktivovaného systému a pro RNA, získanou z RNA, která byla izolována z kontrolního neaktivovaného systému,
- d) izoluje se klon genomu,
- e) chemicky regulovatelný gen z uvedeného klonu genomu se podrobí subklonování a
- f) požadovaný chemicky regulovatelný řetězec DNA se izoluje.

84. V podstatě čistý řetězec DNA, izolovaný způsobem podle bodu 83.

85. Způsob podle bodu 83, v němž systémem, v němž se gen přirodně vyskytuje, je rostlina, vyznačující se tím, že se

- a) v uvedené rostlině aktivuje exprese polyA+RNA z chemicky regulovatelného genu,
- b) tato polyA+RNA se izoluje,
- c) z uvedené polyA+RNA se konstruuje sestava cDNA,
- d) diferenciálnímu sledování se podrobí sestava cDNA s obsahem cDNA, která byla získána z RNA kontrolní rostliny, která nebyla aktivována,
- e) izolují se klony cDNA, které jsou chemicky regulovatelné,
- f) izoluje se klon genomu ze sestavy genomu uvedené rostliny, přičemž jako sondy se užije klonu cDNA ze stupně e),
- g) podrobí se subklonování chemicky regulovatelný gen z uvedeného klonu genomu a
- h) požadovaný chemicky regulovatelný řetězec DNA se izoluje.

86. Způsob podle bodu 85, vyznačující se tím, že chemicky regulovatelným genem je gen pro bílkovinu PR.

87. Způsob podle bodu 86, vyznačující se tím, že gen pro bílkovinu PR je ve stupni a) aktivován chemickým regulátorem pro indukci nebo pathogenem.

88. Způsob podle bodu 87, vyznačující se tím, že se chemický regulátor pro indukci zvolí ze skupiny kyselina benzoová, kyselina salicylová, kyselina acetylosalicylová, kyselina polyakrylová, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylová, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolthiokarboxylová, kyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, amid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové, hydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové, kyselina isonikotinová a deriváty těchto látek.

89. Způsob regulace transkripce chemicky regulovatelného genu, vyznačující se tím, že se na rostlinnou tkáň, rostlinu nebo semena s obsahem chimerního řetězce DNA podle bodu 24 působí chemickým regulátorem.

90. Způsob podle bodu 89, vyznačující se tím, že se chemický regulátor volí ze skupiny kyselina benzoová, kyselina salicylová, kyselina acetylosalicylová, kyselina polyakrylová, kyselina benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylová, kyselina 1,2,3-thiadiazolthio-

karboxylová, kyanobenzo-1,2,3-thiadiazol, amid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové, hydrazid kyseliny benzo-1,2,3-thiadiazolkarboxylové, kyselina dichlorisonikotinová a deriváty těchto látek.

91. Způsob podle bodu 89, vyznačující se tím, že první složkou řetězce DNA v chimérickém řetězci DNA je chemicky indukovatelný řetězec, který je nebo který má podstatnou homologii sledu s chemicky indukovatelným řetězcem genu PR.

92. Způsob podle bodu 89, vyznačující se tím, že chemicky regulovatelný gen je kódem pro fenotypický jev, který se volí ze skupiny genů, ovlivňujících stav vývoje, sterilitu, odolnost proti chorobám, odolnost proti škůdcům, toleranci nebo odolnost proti herbicidům, produkci sekundárních metabolitů nebo produkci stanovitelného enzymu jako značící látky.

93. Způsob podle bodu 92, vyznačující se tím, že uvedeným stanovitelným enzymem, který je značící látkou, je luciferáza (LUX), chloramfenikol-acetyltransferáza (CAT), neomycinfosfotransferáza (NPT), nopalinsyntetáza (NOS), oktopinsyntetáza (OCS), 8-1,3-glukuronitáza (GUS), syntetáza acetohydroxykyseliny (AHAS) nebo endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

94. Způsob podle bodu 93, vyznačující se tím, že uvedeným stanovitelným enzymem, který je užít jako značící látka je β -1,3-glukuromidáza (GUS), syntetáza acetohydroxykyseliny (AHAS), nebo endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

95. Způsob indentifikace chemického regulátoru, vyznačující se tím, že se hostitel transformuje chimérním řetězcem DNA podle bodu 31 nebo vektorem, který tento chimérní řetězec DNA obsahuje, načež se na transformovaného hostitele působí příslušným chemickým regulátorem a měří se exprese fenotypického jevu.

96. Způsob podle bodu 95, vyznačující se tím, že transformovaným hostitelem je rostlinná tkáň nebo rostlinná buňka.

97. Způsob podle bodu 96, vyznačující se tím, že první složkou řetězce DNA v uvedené chimérní DNA je chemicky indukovatelný řetězec, kterým je nebo který má podstatnou homologii řetězce s chemicky indukovatelným řetězcem z genu pro bílkovinu PR.

98. Způsob podle bodu 95, vyznačující se tím, že fenotypickým jevem, pro nějž je kódem chimérní DNA, je stanovitelný enzym.

99. Způsob podle bodu 98, vyznačující se tím, že stanovitelným enzymem, užitým jako značící látky je luciferáza (LUX), chloramfenikolacetyltransferáza (CAT), neomycinfosfotransferáza (NPT), nopalinsynthetáza (NOS), octopin synthetáza (OCS), 8-1,3-glukuronidáza (GUS), synthetáza acetohydroxykyseliny (AHAS) nebo endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

100. Způsob identifikace chemicky regulovatelného řetězce DNA, vyznačující se tím, že se

- a) transformuje hostitel příslušným chemicky regulovatelným řetězcem DNA nebo vektorem, který tento řetězec obsahuje, druhým řetězcem DNA, kterým je selekci umožňující označení, závislé na hostiteli a třetím řetězcem DNA, který je kódem pro fenotypický jev,
- b) na takto transformovaného hostitele se působí příslušným chemickým regulátorem a
- c) měří se exprese nebo se provádí selekce k průkazu změny exprese fenotypického jevu, pro nějž je kódem třetí řetězec DNA.

101. Způsob podle bodu 100, vyznačující se tím, že třetím řetězcem DNA je stanovitelné nebo na hostiteli závislé genové značení.

102. Způsob podle bodu 100, vyznačující se tím, že transformovaným hostitelem je rostlinná tkáň nebo rostlinné buňky.

103. Způsob podle bodu 100, vyznačující se tím, že druhým nebo třetím řetězcem DNA je gen pro odolnost proti herbicidům nebo gen pro odolnost proti antibiotikům.

104. Způsob podle bodu 100, vyznačující se tím, že uvedeným genem je gen pro odolnost proti antibiotikům, které se volí ze skupiny genů pro odolnost proti hygromycinu, kanamycinu, chloramfanikolu, bleomycinu, puromycinu, linkomycinu a methotrexatu.

105. Způsob podle bodu 100, vyznačující se tím, že uvedeným genem je gen pro odolnost proti aminoglykosidfosfotransferáze IV hygromycinu.

106. Způsob podle bodu 100, vyznačující se tím, že třetí řetězec DNA je kódem pro stanovitelný enzym, sloužící k označení, který se volí ze skupiny luciferáza (LUX), chloramfenikolacetyltransferáza (CAT), neomycinfosfotransferáza (NPT), nopalinsyntetáza (NOS), oktopinsyntetáza (OCS), β -1,3-glukuronidáza (GUS), syntetáza acetoxyhydroxykyseliny (AHAS) a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

107. Způsob podle bodu 100, vyznačující se tím, že třetí řetězec DNA je kódem pro stanovitelný enzym, který se volí ze skupiny β -1,3-glukuroni-dáza (GUS), synthetáza acetohydroxykyseliny (AHAS) a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

108. V podstatě čistý chemicky regulovatelný řetězec DNA, vyznačující se tím, že je identifikovatelný způsobem podle bodu 100.

109. Způsob selekce transformovaných rostlinných buněk nebo rostlinných tkání, které byly transformovány DNA, sestávající z první složky řetězce DNA, která je chemicky regulovatelná známým chemickým regulátorem a ze sdruženého řetězce DNA, který je kódem pro fenotypické označení, vyznačující se tím, že se

- a) na příslušné transformanty působí uvedeným známým chemickým regulátorem a
- b) transformanty se podrobí selekci na základě fenotypického jevu, pro nějž je kódem druhý sdružený řetězec DNA.

110. Způsob podle bodu 109, vyznačující se tím, že uvedený fenotypickým jevem je odolnost proti antibiotiku.

111. Způsob podle bodu 110, vyznačující se tím, že odolností proti antibiotiku je odolnost proti hygromycinu, kanamycinu, chloramfenikolu, bleomycinu, puromycinu, linkomycinu, G418 nebo proti methothrexátu.

112. Způsob podle bodu 109, vyznačující se tím, že uvedeným fenotypickým jevem je stanovitelný enzym.

113. Způsob podle bodu 112, vyznačující se tím, že se stanovitelný enzym volí ze skupiny luciferáza (LUX), chloramfenikolacetyltransferáza (CAT), neomycinofosfotransferáza (NPT), nopalinsyntetáza (NOS), oktopinsyntetáza (OCS), β -1,3-glukuronidáza (GUS), syntetázaacetoxyhydroxykyseliny (AHAS) nebo endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

114. Způsob podle bodu 113, vyznačující se tím, že se stanovitelný enzym volí ze skupiny β -1,3-glukuronidáza (GUS), syntetáza acetoxyhydroxykyseliny (AHAS) a endotoxin *Bacillus thuringiensis* (BT).

115. Způsob stanovení účinnosti β -1,3-glukuronidázy, vyznačující se tím, že se uvede do reakce extrakt rostlinné tkáně ve vzorku s objemem

nižším než 0,5 s obsahem 1,5 až 3 mM 4-methylumbelliferylglukuronidu při teplotě přibližně 37 °C na dobu 1 až 5 hodin a pak se stanoví koncentrace takto uvolněného fluorescenčního indikátoru.

116. Způsob stanovení množství specifické RNA v roztoku RNA, vyznačující se tím, že se

- a) RNA označí specifickým oligonukleotidem jako primerem o délce 12 až 18 nukleotidů s vysokou specifickou radioaktivitou,
- b) RNA s označeným nukleotidem se hybridizuje v koncentraci 0,1 až 20 nM po dobu 2 minuty až 24 hodin při teplotě přibližně 37 °C,
- c) oligonukleotid se prodlouží působením reverzní transkriptázy za přítomnosti nukleotidtrifosfátů v koncentraci 0,003 až 1 mmol po dobu 1 až 120 minut a
- d) prodloužené produkty se oddělí a učiní se viditelnými pomocí autoradiografie.

117. Způsob výroby chemicky regulovatelného chimérního řetězce DNA, vyznačující se tím, že se naváže první nekódová, chemicky regulovatelná složka řetězce DNA, schopné regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo rostlinné tkáni, přičemž tato regulace je závislá na působení chemického regulátoru

na druhou složku řetězce DNA, která je schopna transkripce v rostlině nebo v rostlinné tkáni.

118. Způsob výroby chimérního řetězce DNA, který sestává z první složky řetězce DNA, kterým je, nebo který má podstatnou homologii řetězce s nekódovým, chemicky regulovatelným řetězcem DNA v přírodně se vyskytujícím chemicky regulovatelném genu, přičemž tato první složka DNA je schopna regulovat transkripci sdruženého řetězce DNA v rostlině nebo rostlinné tkáni a tato regulace je závislá na chemickém regulátoru, z druhé složky řetězce DNA, kterou je, nebo která má podstatnou homologii řetězce s částí, avšak nikoliv s celým řetězcem transkribovatelné DNA, s níž je první složka řetězce sdružena v přírodně se vyskytujícím, chemicky regulovatelném genu a ze třetí složky DNA, schopné transkripce v rostlině nebo v rostlinné tkáni, vyznačující se tím, že se uvedené složky řetězce na sebe současně nebo postupně naváží.

Zastupuje:

JUDr. Ivan KOREČEK
Advokátní poradna č. 10
115 04 PRAHA 1, Žitná 25

10 30 50 70 90 110
CTCGAGGATTTCAAACTCTAGCTTCACTAAAACTTGAGCTTTCTTTCCACTAATGTCGAAAAACGAAATAACATAAGCTATTTACAAAAATAAAAAATACTCCATTGAACTAAA
130 150 170 190 210 230
GTCAGTCGTGATTGGGATAAGAAAAATAGAAATTTATTTATACTCCAGATCAAGCCGTGATTGGAATGAGATAATAGAAAAGTATGATAGTACATGAGTAACATCAAGTTGGAAATTAAG
250 270 290 310 330 350
GGAAGGAAATTAGAGAAAGAACTGAAGAATATCCAAATATTCTTTACGTCCAAATTTGATAGTTATTTAACGTCATCGAGATGACGGCCATGTTCAAGTTTTCCACAAATATTGAGAAAA
370 390 410 430 450 470
GAAAGAAGAAGACACAACTGTGTTTGGTATTATTATAGTTTTTTCTTTTAGAGAATTGATTGTACATATAAGAAATATAATATAAGATTTAGAAATAAGATTATTAGAAAAATCAAACA
490 510 530 550 570 590
TCAAAGTATTATTATAAATCTTTTCCAATGGACATTCCTCTGAAAAAAGAGATATAAATATGGAAGTAAAAATTAATCAGATCGTTAAATGTAGAAAAATTAATTAACACA
610 630 650 670 690 710
TTAACCATAACCACTCTACTTTATTAAACAAAAAGCACATCTGATAGATCAAAAAAGTGTAACTTCATGCATTGACAAATTTAAAAATTTTTCACATCGGGTAAAACTATTTTACA
730 750 770 790 810 830
ACAATTGGTAACTGCATATATAAGTTTAAATATGGTAACCTAGAAAAATAGGATAAATTATCTATAACAGGATATATTACATTGATATTACCATGTCAAAAAATTTAGTAACTACATGAATA
850 870 890 910 930 950
ATCACCGTAAATCTTCAAGATTCTCTATAAATACCTTGGTAGTAAATCTAGTTTTTCCATTCAGATACAACATTTCTCTATAGTCATGGGATTGTTCTCTTTTCAAAATGGC
MetGlyPheValLeuPheSerGlnLeuPr
970 990 1010 1030 1050 1070
TTCATTTCTCTGTCTCTACACTCTCTTATTCCTAGTAATATCCCACTCTGCGGTGCCAAAAATCTCAACAAGACTATTGGATGCCATAACACAGCTCGTGCAGATGTAGGTGT
oSerPheLeuLeuValSerThrLeuLeuLeuPheLeuValIleSerHisSerCysArgAlaGlnAsnSerGlnGlnAspTyrLeuAspAlaHisAsnThrAlaArgAlaAspValGlyVa
1090 1110 1130 1150 1170 1190
AGAACCTTTGACCTGGGACGACCAAGTAGCAGCTATGCGCAAAATATGCTTCCCAATTGGCTGCAGATTGTAACCTCGTACATTCTCATGGTCAATACGGCGAAAACTTAGCTGAGGG
lGluProLeuThrTrpAspAspGlnValAlaAlaTyrAlaGlnAsnTyrAlaSerGlnLeuAlaAlaAspCysAsnLeuValHisSerHisGlyGlnTyrGlyGluAsnLeuAlaGluGl
1210 1230 1250 1270 1290 1310
AAGTGGCGATTTCATGACGGCTGTAAGGCTGTTGAGATGTGGGTGAGTGAAGAAACAGTATTATGACCATGACTCAAACTACTTGTGCACAAGGACAGGTGTGGACACTATACTCAGGT
ySerGlyAspPheMetThrAlaAlaLysAlaValGluMetTrpValAspGluLysGlnTyrTyrAspHisAspSerAsnThrCysAlaGlnGlyGlnValCysGlyHisTyrThrGlnVa
1330 1350 1370 1390 1410 1430
GGTTTGGCGTAACTCGGTTCTGTTGGATGTGCTAGGGTTCAAGTGAACATGGAGGATATGTTGTCTCTGCAACTATGATCCTCCAGGTAATTATAGAGGCGAAAGTCCATACTAATT
lValTrpArgAsnSerValArgValGlyCysAlaArgValGlnCysAsnAsnGlyGlyTyrValValSerCysAsnTyrAspProProGlyAsnTyrArgGlyGluSerProTyrEnd
1450 1470 1490 1510 1530 1550
GAAACGACCTACGTCAATTCACGTTAATATGTATGGATTGTTCTGCTGATATCAAGAACTTAAATAATGTCTCTAAAAAGCAACTTAAAGTCAAGTATATAGTAATAGTACTATATT
1570 1590 1610 1630 1650 1670 207
GTAATCCTCTGAAGTGGATCTATAAAAGACCAAGTGGTCATAATTAGGGGAAAAATATGAGTTGATGATCAGCTTGATGTATGATCTGATATTATTATGAACACTTTTGTACTCATACT
1690 1710 1730 1750 1770 1790
GAATCATGTGTTGATGGTCTAGCTACTTGCATATTACGAGCAAAATCTTAACTACATGCCTTAGGAACAAGCTTACACAGTTTCATATAATCTACTAGAGGGCCAAAAACATGAAAAAT
1810 1830 1850 1870 1890 1910
ACCAATTAGATGGTAGGAGGATATTGAAAGTGGAGCAGCTAGTTTAACTGACCGTTAGTCTTAAATTTGACGGTATAAAAAATATTACATAATCAGGTCAATTATAAGGTAATTA
1930 1950 1970 1990 2010 2030
TAGGTAAATATTATGACGAATCTCAATAGTAATCTGAAAAAATTTGTAACCTAATCTTATACTAAACTACTATAATAGOTTAGATTACATTAATCATGTCATTAGAAGATCTT

SEQUENCE 1

10 30 50 70 90 110
 T T A C T G T T A A G T A T T C G T A C T C G T A G A T A T T T C A A A A A T T A G A T A G C G A T T T T A T C A T C T A A T C A A C T A T A G A T C T A A G T C G A A A A T A T A C C T T G A G T A T A G A T T T T A
 130 150 170 190 210
 C T T A C C A G C C T T T C A T C T T C T T C C A G A A A T A A G A G T G G A A A T C A A C G G T A G C A G A T A A C G T T G A G A T A T G A T C T T G T A G T A A T T G A C A C C T A A C G G G A C T G C T T T C C T T T
 230 250 270 290 310 330
 A A A T A T A G A C G A T A A T A T C A G T T A T A A G G A T G C T T T C A C T T T C T A A T T A A A G C A T A T T C T G A T T C G G T T T T A T A G A A T T T G A T A G A A G T T A G A C A G C A T C C C T C C A A T T
 350 370 390 410 430
 G A A C A G G T T C G A T T A C T C A A C T T C C G T C T A C T T A A C A A A T T C A A C T C T T T T C G C G T A C T A T A T T T A T G T T A A A A T A C A C T G G T A A T A A T G T A T A A A C T A T A T G T A T G
 450 470 490 510 530 550
 T A T A T A A T A A C T T C A T G A T T T A T C A A A G T T G G T C A A A T T A T G A T C A T G C T A T A A T A G T T G T T C A T C A A T A G A T A G A A T T T T T A A T G G C G G C T T T T G T T T C T T A A C
 570 590 610 630 650
 G A A T A T G A T C T A A C G T T C T T T G A A T T A A C G G A G C T A T A A T T T A T A C T A T T C T T T T C A A T A T G G C T A A A G A G T T T G C T A A C A A G T T G C A A A C T T T G T A A C T C A G C T A T A
 670 690 710 730 750 770
 T T C T T C C C T A T A A A A T C A T C C T T A C T A T G C T T T G T T T C T C A C C A A A C A C A A A A T G G G A T T C T T A C A C A A T A G T T G C T T G T T C A T T A C C T T T G C A A T A T T A A T T C
 MetGlyPheLeuThrThrIleValAlaCysPheIleThrPheAlaIleLeuIleH
 790 810 830 850 870
 A C T C A T C C A A A G C T C A A A A C T C C C C C A A G A T T A T C T T A A C C C T C A C A A T G C A G C T C G T A G A C A A G T T G G T G T T G G C C C C A T G A C A T G G G A C A A T A G G C T A G C A G C C T A T
 isSerSerLysAlaGlnAsnSerProGlnAspTyrLeuAsnProHisAsnAlaAlaArgArgGlnValGlyValGlyProMetThrTrpAspAsnArgLeuAlaAlaTyr
 890 910 930 950 970 990
 G C C C A A A A T T A T G C C A A T C A A A G A A T T G G T G A C T G C G G G A T G A T C C A C T C T C A T G C C C T T A C G G C G A A A C C T A G C C G C G C C T T C C C T C A A C T T A A C G C T G C T G G T G C
 AlaGlnAsnTyrAlaAsnGlnArgIleGlyAspCysGlyMetIleHisSerHisGlyProTyrGlyGluAsnLeuAlaAlaPheProGlnLeuAsnAlaAlaGlyAl
 1010 1030 1050 1070 1090
 T G T A A A A T G T G G G T C G A T G A G A A G C G T T T C T A T G A T T A C A A T T C A A A T T C T T G T G T A G G A G A G T A T G T G G A C A C T A T A C T C A G G T G G T G G C G T A A C T C A G T A C G T C
 aValLysMetTrpValAspGluLysArgPheTyrAspTyrAsnSerAsnSerCysValGlyGlyValCysGlyHisTyrThrGlnValValTrpArgAsnSerValArgL
 1110 1130 1150 1170 1190 1210
 T C G G T T G T C T A G G G T T C G A A G C A C A A T G G T T G G T T T T C A T A A C T T G C A A T T A T G A T C C A C C A G G T A A T T T T A T A G G A C A A C G T C C C T T T G G C G A T C T T G A G G A G C A A
 euGlyCysAlaArgValArgSerAsnAsnGlyTrpPhePheIleThrCysAsnTyrAspProProGlyAsnPheIleGlyGlnArgProPheGlyAspLeuGluGluGln
 1230 1250 1270 1290 1310
 C C C T T G A T T C C A A A T T G G A A C T T C C A A C T G A T G T C T A A T G A G T G C A C G T A C A T G A A C A A A T T A T C A T G A A T A A A G G A A A A T A A A A T G C A G T G C T A T G C T A T G T G A T T T
 ProPheAspSerLysLeuGluLeuProThrAspValEnd

SEQUENCE 2 (1)

1330 1350 1370 1390 1410 1430
AGCTTCCAGTTGGATAAATACTGATGGTGTAGTAAC TGCCGAGTGTTTGGACCCTACCTTGCATGTTGGTAGATGGAATCAGTTTATATATGAGTTTTCTGTTGGCT
1450 1470 1490 1510 1530
TATGTTATTTTATTAAAACTTATTCTAGTTTTACAGTTTTTATTTCGCACTATATGTGTATGGGTCCAAATTTGATCGACCACGACCTATGACGAGTACAACAAACGA
1550 1570 1590 1610 1630 1650
CCGGGTACCTTCGAATCGGCGTCCCAAGGGAAACGACCCTAGGGCGAAAGAAGAGACTGTATGACTCTTGTAGTAGTGAAGCCCATTAGGGAACATTAAAGATATTCCG
1670 1690 1710 1730 1750
CCGAATACTAATTGTATTTTGTCTTACAAATTCGGAAGGGTTTCTCTCTAGTATATAAAGGGGACAAAAACCTTGTAAGTGGCGGTGGATACTCTGAGAAGCTTACTA
1770 1790 1810 1830 1850 1870
ATCTTGATGAAAAGAAAACTCTCTCTCTTATCTATTATTATTCTAGAGATTATTATCTTCAGCTACGATTACCCCTTCATCTTGATTGATTGTTCAAAAAGGT
1890 1910 1930 1950 1970
TTTAACATCTTTTGAGTCAAACAATTGGCNC CGTCTATGGGGAATTTCTATAGCTGAAATCATAGTTCTCATCTAGATTTCTGAAGTGATAATTACTTTTCTTCAAACCT
1990 2010 2030 2050 2070 2090
CATAAAAATCAACAATGGCSGGAAGGAAGTGAAGCTAAAGGCGGTASAGATCGTCTCGAATAACTCCTGAACTCCCTCAACGAAGACGGCAGAGAAGACAATGAGAATA

10 30 50 70 90
 AAAGAAAGCTCTTTAAGCAATGGCTGCCACAAAATAACTACAACCTTTCCATCTTCTCCTCTTTCTCTATTTTCCGCTCTTCCGACGGGCTGGA
 M A A H K I T T T L S I F F L L S S I F R S S D A A G
 110 130 150 170 190
 ATCGCCATCTATTGGGGTCAAAACGGCAACGAGGGCTCTCTTGCACTCCACCTGCGCAACTGGAACACTACGAGTTCGTCAACATAGCATTCTCTCATCCT
 I A I Y W G Q N G N E G S L A S T C A T G N Y E F V N I A F L S S F
 210 230 250 270 290
 TTGGCAGCGGTCAAGCTCCAGTTCTCAACCTTGCTGGTCACTGCAACCTGACAACAACGGTTGCGCTTTTTTGAGCGACGAAATAAACTCTTGCAAAAG
 G S G Q A P V L N L A G H C N P D N N G C A F L S D E I N S C K S
 310 330 350 370 390
 TC AAAATGTCAAGGTCTCTCTCTATCGGTGGTGGCGCGGGGAGTTATTCACTCTCTCTCGCCGACGATGCGAAACAAGTCGCAAACTTCATTGGAAC
 Q N V K V L L S I G G G A G S Y S L S S A D D A K Q V A N F I W N
 410 430 450 470 490
 AGCTACCTTGGCGGGCAGTCGGATTCCAGGCCACTTGGCGCTGCGGTTTTGGATGGCGTTGATTCGATATCGAGTCTGGCTCGGGCCAGTTCTGGGACG
 S Y L G G Q S D S R P L G A A V L D G V D F D I E S G S G Q F W D V
 510 530 550 570 590
 TACTAGCTCAGGAGCTAAAGAAATTTGGACAAGTCATTTTATCTGCCGCGCGCAGTGTCCAATACCAGACGCTCACCTAGACGCCGCGATCAAACTGG
 L A Q E L K N F G Q V I L S A A P Q C P I P D A H L D A A I K T G
 610 630 650 670 690
 ACTGTTTCGATTCCGTTTGGGTTCAATTCTACAACAACCCGCCATGCATGTTTGCAGATAACGCGGACAATCTCTGAGTTCATGGAATCAGTGGACGGCG
 L F D S V W V Q F Y N N P P C M F A D N A D N L L S S W N Q W T A
 710 730 750 770 790
 TTTCCGACATCGAAGCTTTACATGGGATTGCCAGCGGCACGGGAGGCAGCGCGAGCGGGGATTATTCCGGCGGATGTGCTTATTCTCAAGTTCTTC
 F P T S K L Y M G L P A A R E A A P S G G F I P A D V L I S Q V L P
 810 830 850 870 890
 CAACCATTAAGCTTCTTCAACTATGGAGGAGTGATGTTATGGAGTAAGGCGTTTGACAATGGCTACAGCGATTCCATTAAAGGCAGCATCGGCTGAAG
 T I K A S S N Y G G V M L W S K A F D N G Y S D S I K G S I G *
 910 930 950 970 990
 GAAGCTCTAAGTTTAATTTTAATTAAGCTATGAATAAACTCCAAAGTATTATAATAATTAAAAAGTGAGACTTCATCTTCTCCATTAGTCTCATATT
 1010 1030 1050 1070 1090
 AAATTAGTGTGATGCAATAATTAATATCCTTTTTTTCATTACTATACTACCAATGTTTTAGAAATTGAAAAGTTGATGTCAATAAAAACATTCCAAGTTTA
 TTT

SEQUENCE 3

JUDr. Ivan KOREČEK
 A. J. K. 10
 115 04 PRAGA 1, č. 10

1	AAAAAGAAAA	AAAAAATGAA	CTTCCTCAAA	AGCTTCCCCT	TTTTTGCCCTT
51	CCTTTATTTT	GGCCAATACT	TTGTAGCTGT	TACTCATGCT	GCCACTTTTG
101	ACATTGTCAA	CAAATGCACC	TACACAGTCT	GGGCCGCGGC	CTCTCCAGGT
151	GGAGGCAGGC	GGCTCGACTC	AGGCCAATCT	TGGAGCATT	ATGTGAACCC
201	AGGAACAGTC	CAGGCTCGCA	TTTGGGGTGC	AACCAATTGC	AACTTCGATG
251	GCAGTGGCCG	AGGTAATTGT	GAGACTGGAG	ACTGTAACGG	GATGTTAGAG
301	TGTCAAGGCT	ATGGAAAAGC	ACCTAACACT	TTAGCTGAAT	TTGCACTTAA
351	TCAACCCAAT	CAGGACTTTG	TCGACATCTC	TCTTGTTGAT	GGATTTAACA
401	TCCCCATGGA	ATTCAGCCCG	ACCAATGGAG	GATGTCGTAA	TCTCAGATGC
451	ACAGCACCTA	TTAACGAACA	ATGCCCAGCA	CAGTTGAAAA	CACAAGGTGG
501	ATGTAACAAC	CCATGTACTG	TGATAAAAAC	CAATGAATAT	TGTTGTACAA
551	ATGGGCCTGG	ATCATGTGGG	CCTACTGATT	TGTCGAGATT	TTTAAAGGAA
601	AGATGCCCTG	ATGCTTATAG	TTATCCACAG	GATGATCCAA	CCAGTTTGT
651	TACGTGTCCT	TCTGGTACTA	ATTACAGGGT	TGTCTTCTGC	CCTTGAAATT
701	GAAGCCTGCA	AAATTATGAC	TATGTAATTT	GTAGTTTCAA	ATATATAAGC
751	TACACAAGTA	GTACTAAGCA	CTATTAAATA	AAAAAGAGAG	TGACAAAGAG
801	GAGAGGCTGT	GGGTCAGATT	CTCTTGTTGC	CTGTTGTCGT	TGTTGTAGCA
851	TTCTGGTTTT	AAGAAATAAA	GAAGATATAT	ATCTGCTAAA	TTATTAAATG

SEQUENCE 4

PROJEKT KREČEK

```

10          30          50          70          90
AAAAAGAAAAAAAAAATGAACCTTCCTCAAAAGCTTCCCCTTTTGGCTTCCTTTATTTGGCCAATACTTTGTAGCTGTTACTCATGCT
MetAsnPheLeuLysSerPheProPhePheAlaPheLeuTyrPheGlyGlnTyrPheValAlaValThrHisAla

110          130          150          170
GCCACTTTTGACATTGTCAACAAATGCACCTACACAGTCTGGGCCGCGGCCTCTCCAGGTGGAGGCAGGCGGCTCGACTCAGGCCAATCT
AlaThrPheAspIleValAsnLysCysThrTyrThrValTrpAlaAlaAlaSerProGlyGlyGlyArgArgLeuAspSerGlyGlnSer

190          210          230          250          270
TGGAGCATTAAATGTGAACCCAGGAACAGTCCAGGCTCGCATTGGGGTGAACCAATTGCAACTTCGATGGCAGTGGCCGAGGTAATTGT
TrpSerIleAsnValAsnProGlyThrValGlnAlaArgIleTrpGlyArgThrAsnCysAsnPheAspGlySerGlyArgGlyAsnCys

290          310          330          350
GAGACTGGAGACTGTAACGGGATGTTAGAGTGTCAAGGCTATGAAAAGCACCTAACACTTTAGCTGAATTTGCACTTAATCAACCCAAT
GluThrGlyAspCysAsnGlyMetLeuGluCysGlnGlyTyrGlyLysAlaProAsnThrLeuAlaGluPheAlaLeuAsnGlnProAsn

370          390          410          430          450
CAGGACTTTGTGACATCTCTTGTGTGATGGATTAAACATCCCATGGAATTGAGCCCGACCAATGGAGGATGTCGTAATCTCAGATGC
GlnAspPheValAspIleSerLeuValAspGlyPheAsnIleProMetGluPheSerProThrAsnGlyGlyCysArgAsnLeuArgCys

470          490          510          530
ACAGCACCTATTAACGAACAATGCCAGCACAGTTGAAAACACAAGGTGGATGTAACAACCCATGTACTGTGATAAAAAACCAATGAATAT
ThrAlaProIleAsnGluGlnCysProAlaGlnLeuLysThrGlnGlyGlyCysAsnAsnProCysThrValIleLysThrAsnGluTyr

550          570          590          610          630
TGTTGTACAAATGGGCCTGGATCATGTGGCCTACTGATTTGTGAGATTTTAAAGGAAAGATGCCCTGATGCTTATAGTTATCCACAG
CysCysThrAsnGlyProGlySerCysGlyProThrAspLeuSerArgPhePheLysGluArgCysProAspAlaTyrSerTyrProGln

650          670          690          710
GATGATCCAACCAAGTTTGTGTTACGTGTCCTTCTGGTACTAATTACAGGGTGTCTTCTGCCCTTGAAATGAAGCCTGCAAAATTATGAC
AspAspProThrSerLeuPheThrCysProSerGlyThrAsnTyrArgValValPheCysProEnd

730          750          770          790          810
TATGTAATTTGTAGTTTCAAATATATAAGCTACACAAGTAGTACTAAGCACTATTAATAAAAAAGAGAGTGACAAAGAGGAGAGGCTGT

830          850          870          890
GGGTCAGATTCTTGTTTCGCTGTTGTCGTTGTTAGCATTCTGGTTTTAAGAAATAAAGAAGATATATATCTGCTAAATTATTAAATG

```

SEQUENCE 4 (a): Sequence 4 plus amino acid sequence of
 polypeptide encoded by the coding region of
 the gene

1 GAGCTCCTCT AGGGGGCCAA GGCAAACCTT TTTGCTAATG GGAAAAAAT
 51 ATTAGACCAA GAGTTTGTA TAGCTACTCA ATTTCAATTT ACAAAGGGGA
 101 AAATTTAACT GTTTTGCCCT TATATCTTTT GTCCCGAAA CATAAAATAT
 151 CCCATCCGAA ATTCCAAATG GTCCATTATC GGCAAGTAGC TTTCTTTTAT
 201 TATAGTTAGT TGACAAAACA CTATCGAGAT ATCATTAGTA TAATAATAAC
 251 TTCAAAGTCC ATCTTCTTAG CTGCCTCCTC ATTAGAGCCG CCACTAAAAT
 301 AAGACCGATC AAATAAAAGC CGCCATTAAA ATAATGAATT TTAGGACTCT
 351 CAATTGTCAC GTAAGTGCCA AACTCTTCC AATACTTTGC TGCAACTTGG
 401 GGCTGCTAGC TTCTGAGCTT CCTGGGATAT TTCTATGTTT ATCTCTTAAT
 451 TTACATCTCA ACTAATATCA AGAAATTAAA CAGGTGCAGC AAATCATAAA
 501 ATTTTCCTCT AAAGAAGAAA ATGACTCCGG TTAGTGATTC ATTGGCCTTT
 551 TCAGAGTCTG CGTGCCATAT TCACTAATGG GTCGTTTGGT ACAAGAAATA
 601 ATGATAATAA TTTCGAAATA GAATTTGGGA TTTCATTTAT TTCATATTTA
 651 ATTATAAATA TTAGCTAATT TCGAAATAAA TTTTACATTA AAATAGTGAA
 701 ATCAACTATC TCATATATAA GGTGGAATAG CTAATCTCAT AGCCACCTCA
 751 GTTAGAATCC AGTTTCCTCT AATAAATGCA GCGAAATATT AGAAGACTTT
 801 CATTAAATCA ATTCATATAA TTTAAAATA CTAGACATGG AAAAAAAAAA
 851 CGATTGAGA CTGTTATGGA AGGCGTTGCC TTCGATGTAG ATTCTCATCC
 901 ATTGCTTTTCG TGCAATAGCA ATATGACATC TTATTCTTAG AACTACTTTT
 951 AAATGAAAGT CATATAGAAC TTTAAATCT CTCAACTAGT TTTAAGGGAA
 1001 TTCAAATAC GACCAATATT TATTACTTAC TTATGGATAA ATTTAAATAA
 1051 TATGTATTTT ATCTTGAAAT TGAATTGAAA ATATTAAATT ACTTGTTTA
 1101 ATATAAACAA TAGATATCGT TAAGTATTTA CCACAAACAT TTTATTAGTT
 1151 GTAACGATGA TTAAGCAGGA ATTCCTCTGG TTGTGCAGGA TGAAAGAAAC
 1201 TAACTAGCTA TAATTTCTTT TGTAAGTCA AGATAGTACG GCACCTTATG
 1251 GAGAAAATAA ATAACCTTAC ATCATCAAAC TCATCTTCTT TTTCCACAA
 1301 AATGATCAAG TTGACATGTT AATAGCCAGG TCACCGGGGG CGGCTCTTAA
 1351 CTTCATTAGC CTACGAATAA CAAATCCAAT ATTATATTTA CACAAGGCTA

SEQUENCE 5 (1)

1401 TATATATATC TCAATATAAA TAGCTCGTTG TTCATCTTAA TTCTCCCAAC
 1451 AAGTCTTCCC ATCATGTCTA CCTCAÇATAA ACATAATACT CCTCAAATGG
 1501 CTGCTATCAC ACTCCTAGGA TTACTACTTG TTGCCAGCAG CATTGACATA
 1551 GCAGGTTTCT GGTCAAATAT TTGAAC TTCC CAGCCAAAAA TATTGTCTTA
 1601 TAATTTTGTG TGCGCAAAAT TTTAATTTAG TTGATAGTTA TTTGCTTATT
 1651 TTTCTTTTCA AATTGCTTGT GTTTTTTTCT CAAATTAACT TGCACCGTAT
 1701 TCATTTAGCG ATAGTTATTT GCTCTATTTT TGTGTAACAC TCACTCACAA
 1751 ACTTTTCAAT TTGAGGGGAG GACAGTGAAT CTAAGATTGA AATTTATGAG
 1801 TTTAATTAGA CTAATTCCCA TTTGATTTAT TGGCTAGAAG TCAATTATTT
 1851 GCATAGTGAG TCTTTTAACA CACAGATTTG AGTTAAAGCT ACTACGTTCTG
 1901 TATTAACCCA TAACATATAC ACCTTCTGTT CTAATTTCTT TGACACTTTT
 1951 TGTTAGTTTG TTCCAAAAAG GACGGACATA TTTGATATTT GAGAATACTT
 2001 TACCTTAACC TTAATAGAAT TTTTATGAC ATCACATATA TTATGGAATA
 2051 TATACGACCA TAATTTTCAA ATATCTTATA GTCGTACAAA TATTATAGCA
 2101 TGTTTAATAC CACAAC TTTC AAATTCTTCT TTTCTTAAA AACAAAATAT
 2151 GTCACATAAA TTAAATAGA GGAAGTATAC TACATCAATC AGCCCCTAGT
 2201 GGAGGGGACC CTACTGTAAG TTTTAAAGTT TTCAAGAATT CAGTAATTGA
 2251 TTAGGAGCCC GTCTGGACAT AAAAAAAAAAAT TCCTTTTTTTT CCAAAAAATG
 2301 CCCACTAAAT TTCTAACACT ATTTTGTAAT TCTTATTGAG CAGGGGGCTC
 2351 AATCGATAGG TGTTTGCTAT GGAATGCTAG GCAACAAC TT GCCAAATCAT
 2401 TGGGAAGTTA TACAGCTCTA CAAGTCAAGA AACATAGGAA GACTGAGGCT
 2451 TTATGATCCA AATCATGGAG CTTTACAAGC ATTAAAAGGC TCAAATATTG
 2501 AAGTTATGTT AGGACTTCCC AATTCAGATG TGAAGCACAT TGCTTCCGGA
 2551 ATGGAACATG CAAGATGGTG GGTACAGAAA AATGTTAAAG ATTTCTGGCC
 2601 AGATGTAAAG ATTAAGTATA TTGCTGTTGG GAATGAAATC AGCCCTGTCA
 2651 CTGGCACATC TTACCTAACC TCATTTCTTA CTCCTGCTAT GGTAAATATT
 2701 TACAAAGCAA TTGGTGAAGC TGGTTTGGGA AACAACATCA AGGTCTCAAC
 2751 TTCTGTAGAC ATGACCTTGA TTGGAAACTC TTATCCACCA TCACAGGGTT
 2801 CGTTTAGGAA CGATGCTAGG TGGTTTGTTG ATCCCATTTG TGGCTTCTTA
 2851 AGGGACACAC GTGCACCTTT ACTCGTTAAC ATTTACCCCT ATTTCAAGTTA

SEQUENCE 5 (2)

2901	TTCTGGTAAT	CCAGGCCAGA	TTTCTCTCCC	CTATTCTCTT	TTTACAGCAC
2951	CAAAATGTGGT	GGTACAAGAT	GGTTCCC GCC	AATATAGGAA	CTTATTTGAT
3001	GCAATGCTGG	ATTCTGTGTA	TGCTGCCCTC	GAGCGATCAG	GAGGGGCATC
3051	TGTAGGGGATT	GTTGTGTCCG	AGAGTGGCTG	GCCATCTGCT	GGTGCATTTG
3101	GAGCCACATA	TGACAATGCA	GCAACTTACT	TGAGGAACTT	AATTCAACAC
3151	GCTAAAGAGG	GTAGCCCAAG	AAAGCCTGGA	CCTATTGAGA	CCTATATATT
3201	TGCCATGTTT	GATGAGAACA	ACAAGAACCC	TGAACTGGAG	AAACATTTTTG
3251	GATTGTTTTTC	CCCCAACAAAG	CAGCCCCAAAT	ATAATATCAA	CTTTGGGGGTC
3301	TCTGGTGGAG	TTTGGGACAG	TTCAGTTGAA	ACTAATGCTA	CTGCTTCTCT
3351	CGTAAGTGAG	ATGTGAGCTG	ATGAGACACT	TGAAATCTCT	TTACATACGT
3401	ATTCCTTGGA	TGGAAAACCT	AGTAAAAACA	AGAGAAATTT	TTTCTTTATG
3451	CAAGATACTA	AATAACATTG	CATGTCTCTG	TAAGTCCTCA	TGGATTGTTA
3501	TCCAGTGACG	ATGCAACTCT	GAGTGGTTTT	AAATTCCCTT	TCTTTGTGAT
3551	ATTGGTAATT	TGGCAAGAAA	CTTTCTGTAA	GTTTGTGAAT	TTCATGCATC
3601	ATTAATTATA	CATCAGTTCC	ATGTTTGATC	AGATTGGGAT	TTGGTAACTT
3651	CAATGTTTAG	TTATTTATTA	ATTAGTGTCT	TTATCATTTG	ACTATCAATT
3701	AATCTTTATT	TGGCAAGGCT	TGATATATTT	GAGTTACTCT	TAGGTATTTG
3751	CAAGCAACTG	ATCTTTCTTT	TATCCCGTTT	CTCCGTTAAA	CCTCATTAGA
3801	AATATATTAT	AATGTCACCT	ACTCTGTGGT	TTAAGACATT	CCCTTACATT
3851	ATAAGGTATT	TCACGTCGTA	TCAGGTCGAA	AAAAATAATG	GTACGCTCTT
3901	TCTTATCACA	AATTTCTCTC	AACTTCTAGA	CCAATTGAAT	CTTGTCTCCA
3951	ATAAGCATTG	CTTTTACTGT	ATGTTTCTCT	CTATCAATTC	AAGGCTCAAG
4001	CCATCAAATC	GCTTGGTATT	TCTCGCTCCC	ATTTAACCAA	TCGAGCTGTT
4051	AGCTCTGCTA	AAGTCTCATT	CTTCAGCTTC	TCAAACCACT	CAGAGCTTCT
4101	CCAACCAAAA	ATGTAGAAAA	AATCTTTGAT	CCACATGTAA	AACCCAGAA
4151	TTGTCATT CG	AGTGAAGGAA	GGTGCTGGAA	ACGCGACATC	AAACACGGAT
4201	TTGCCAGCTG	ATTGTCATAG	GAAAAAGAAA	AGTTGATCAG	ATAGTTCGTG
4251	CGGGGTATTT	CCTACCTCGC	CTTTGATCAT	AGCTCTAGGC	TTGCGAAACT
4301	AAGTTATGCA	CGAGGCCCCC	TGCGAATCCA	TAAATCTAAG	AAGCATGCCA
4351	CAACAAACGG	GATAACTTCC	AGCTAAGAGA	TCTATTTTGA	TCTTACCCAC
4401	AAACTAGCTC	CGTGTGAATT	GTCCATTTCA	TCAACTCCAA	AGGCAGGAAA
4451	GAAGACTCTA	TTCAGAGAGC	AGCAAAAGAG	CTC	

SEQUENCE 5 (3)

JUDr. Ing. KOREČEK
A. J. K. 1. 19
115 04 PRAGA 1, 204 04

1	GAGCTCCCTT	GGGGGGCAAG	GGCAAACTT	TTTGCTAAAT	GGAAAAATAT
51	TATACCAAGT	GTTTGTAATA	GTTACTCAAT	TTGAATTAAC	AAAGGGGGCAA
101	ATTTGACTAT	TTTGCCCTTA	TATCTTTTGG	TCACAAAAAC	ATAAAATATC
151	CCATCCGAAA	TTCCAAATGG	TCCATTATCG	GCAAGTAGCT	TTCTTTAATT
201	ATAGTTAGTT	GACAAAACAC	TATCAAGATA	TCATTATTAT	AATAATAACT
251	TCAAAGTCCA	TCATCTTAGC	TGCCTCCTCA	GTAGAGCCGC	CAGTAAAATA
301	AGACCGATCA	AATAAAAAGCC	GCCATTAAAA	TAATGAATTT	TAGGACTCTC
351	GATTGGCACG	TAAGTGCCAA	AACTCTTCCA	ATACTTTGCT	GCAACTTGGG
401	GCTGCTAGGT	TCTGAGCTTC	CAGATATGGG	ATATTTCTAA	GTTTATCTCC
451	TAATTTACAT	CTCAACTAAT	ATTAAGAAAT	TAAACAGGTA	CAGCAAATCA
501	TAAAATTTTC	CTCTAAAGAA	GACAATGAAT	CCGGTTACTG	ATTCATTGGC
551	CTTTTCAGAG	TCTGCATGCC	ATATTCACTA	AGGGGTCGTT	TGGTACAAGA
601	AATAATAATA	ATAATTTTCGG	GATAGAATTT	GAGATTGCAT	TTATCTTGTTG
651	TTTAATTATA	AGTATTAGCT	AATTTTCAGAA	TAAATTTTAC	ACTAAAATAG
701	TAAAATCAAC	TATCACATGT	AGAAGGTGGA	ATGGAATAGC	TAATCCCATA
751	GCCACTCACA	TAGAATATCC	TTATTTATCT	CACTATTTTA	CCAAATGATC
801	GGTTAGTCTT	CATGAGAATC	CAGTATCCTC	AATAAATGCA	GTAAGAAGTT
851	AGAAAAATTTT	CATTAAATCA	ATTCATATAA	TTTAAAAATA	TTAGATATGG
901	AGCACTTAAG	ATACAATAAA	AGATGTACCG	TTAATAATAA	AAGATAAGAT
951	AGAGTTTTAA	ATAGGAAAAA	AAAAACGGTT	CGAGACACTC	TTATGGAAGG
1001	CGTTGTCTTC	AAAGTAGATT	CTCATTCAAT	GCTCTGGTGC	AATAGCAAAA
1051	TGACATCTTA	CTCTTAAGAT	ACAGCGAGCC	ACTCTACAAT	CTTCTATTGT
1101	ATACTCAAAT	GAAAGTTTTA	GAGAACTTTC	AAATCTCTCA	ACTACTTTTA
1151	AGGGAATTCA	AAATACGACC	AATATTTATT	ACTTACTTAC	TTATAGTTAA
1201	ATGATATGAA	TTTTATTTTA	AATTTGAATT	GAAAATATTA	AATTACTTGA
1251	TTTAATATAA	ACAATAGATA	TCGCTAAGTA	TTTACCACAA	ACATGGAGAT
1301	ACTACAGAAG	ATTTTATTAT	TTGTAACGAT	GATTAAGCAG	CTATTCATCT
1351	GGTTGTGCAG	GATGAAAGAA	AGTAACTAGC	TATAATTTCT	TTTGTAAGT

SEQUENCE 6 (1)

~~SECRET~~

SEQUENCE 6 (2)

[Handwritten signature]

2901 CATGACCTTG ATTGGAACT CTTATCCACC ATCACAGGGT TCGTTTAGGA
 2951 ACGATGCTAG GTGGTTTACT GATCCAATTG TTGGGTCTT AAGGGACACA
 3001 CGTGACCTT TACTCGTTAA CATTTACCCC TATTTACAGCT ATTCTGGTAA
 3051 TCCAGGGCAG ATTTCTCTCC CCTATTCTCT TTTTACAGCA CCAAATGTGG
 3101 TAGTACAAGA TGGTTCACGC CAATATAGGA ACTTATTTGA TGCAATGCTG
 3151 GATTCTGTGT ATGCTGCCCT CGAGCGATCA GGAGGGGCAT CTGTAGGGAT
 3201 TGTTGTGTCC GAGAGTGGCT GGCCATCTGC TGGTGCAATT GGAGCTACAT
 3251 ATGACAATGC AGCAACTTAC TTGAGGAACT TAATTCAACA CGCTAAAGAG
 3301 GGTAGCCCAA GAAAGCCTGG ACCTATTGAG ACCTATATAT TTGCCATGTT
 3351 TGATGAGAAC AACAAGAACC CTGAACTGGA GAAACATTTT GGATTGTTTT
 3401 CCCCCAACAA GCAGCCCCAA TATAATCTCA ACTTTGGGGT CTCTGGTGGT
 3451 GTTTGGGACA GTTCAGTTGA AACTAATGCT ACTGCTTCTC TCATAAGTGA
 3501 GATGTGAGAT GAGACACTTG AAATCTCTTT ACATAAGTAT TGCTTAGATG
 3551 GAAAGCTTAG TAAAAACAAG AGAAATTTAT TCTTCATGCA AGACACTAAA
 3601 TAACATTGCA CGTCTCTGTA AGTCCTCATG GATTGTTATC CAGAGACGAT
 3651 GCAACTCTGA GTGGTTTTAA ATCCCTTTTC TTTGTGATGT TGGTAATTTG
 3701 GCAAGAACT TTCTGTAAGT TTGTGAATTT CATGACTTTC TGTAAGTTTG
 3751 TGAATTTTCA GCACCATCAA TTATACATCT TTTCCATGTT TGATCACATT
 3801 AGGATTTGGT AATTGCAAAG TTTAGTTATT TATTAATTAG TGTCTTTATC
 3851 ATTTGACTCG ATCAATTAAT CTTTAATTGG TAAGGCTTGA TATATCGGAG
 3901 CGACTCTTAG GTAGTGGCAT TCAACTGATC TTTCTGTTAT CCCATGTCTC
 3951 CGTTAACCTT CATTAGAAAT ATATTATAAT GTCACCTAAA TCAGAGGTTT
 4001 TAGAGCTTCA AAATCGATTG ACAACAGTTT TGGAGTTACA CTGTGGTTTA
 4051 GGACATTCTG TTACATTATA AGGTATTTCA CGTCGTATCA AGGTGCAATA
 4101 AAATAATGGT ACGCTCTTTC TTATCACAAA TTTCTCTCAA CTTCTAGACC
 4151 AATTGAATCT TGTCTCCAAT AAGTATTGCT TTTACTCTAT GTTTCTCTCT
 4201 ATCAATTCAA GGCTCAAGCC ATCAAATCGC TTGGTATTTT TCGCTCTCAA
 4251 TTAACCAATC GAGCTGTTAA CTCTGCTAAA GTCTCATTCT TCAGCTTCTC
 4301 AAACCACTCA AAGCTTCTCC AACAAAAAAA GTAGAAAAAA ACTTTGATCC
 4351 ACATGTAAAA CCCCATAAAC ATGTCATTCT AGTGAAGGAA GGTGCTTGAA

SEQUENCE 6 (3)

4401 ATGCAACGAA CAAACACGGC TTTGCCACTG CTTGTGATAG GTAAAAGAAA
4451 ACTTGATTAG ATAGTTCGTG CGGGGCATTT CCTACCTCGC CTTTGATCTT
4501 AGCTTTAGGC TTGCGAAACT AAGTAGAACC TAAGGCCCCA GCGAATCCGT
4551 AAATCTGAGG AGCATGCCAC AGCAAAAAGG TTAGCTTTCA GATAAGAGAT
4601 CTATTTGATC TTACCCACTA ACTAGCTCTG TGTGAATTGT CCATTTTCATC
4651 AACTCCAAAG GCAGGAAAGA AGACTATTGA GAGAGCAGCA AAAGAGCTC

SEQUENCE 6 (4)

1- 50 AAAAAAAAAA AAAAACATAA GAAAGTACAG AGGAAAATGG AGTTTTCTGG
 51-100 ATCACCAATG GCATTGTTTT GTTGTGTGTT TTTCTGTTC TTAACAGGGA
 101-150 GCTTGGCACA AGGCATTGGT TCTATTGTAA CGAGTGACTT GTTCAACGAG
 151-200 ATGCTGAAGA ATAGGAACGA CGGTAGATGT CCTGCCAATG GCTTCTACAC
 201-250 TTATGATGCA TTCATAGCTG CTGCCAATTC CTTTCCTGGT TTTGGAAC TA
 251-300 CTGGTGATGA TACTGCCCCG AGGAAAGAAA TTGCTGCCTT TTTCCGGTCAA
 301-350 ACTTCTCACG AAAC TACTGG TGGATCCCTG AGTGCAGAAC CATTTACAGG
 351-400 AGGGTATTGC TTTGTTAGGC AAAATGACCA GAGTGACAGA TATTATGGTA
 401-450 GAGGACCCAT CCAATTGACA AACC GAAATA ACTATGAGAA AGCTGGAAC T
 451-500 GCAATTGGAC AAGAGCTAGT TAACAACCCT GATTTAGTGG CCACAGATGC
 501-550 TACTATATCA TTCAAAACAG CTATATGGTT TTGGATGACA CCACAGGACA
 551-600 ACAAGCCATC TTCCCACGAC GTTATCATCG GTCGTTGGAC TCCGTCTGCC
 601-650 GCGGATCAGG CGGCGAATCG AGTACCAGGT TACGGTGTA TACCAACAT
 651-700 CATTAACGGT GGAATTGAAT GTGGCATAGG ACGGAATGAC GCAGTGAAG
 701-750 ATCGAATTGG ATACTACAGG AGGTATTGTG GTATGTTAAA TGTGCTCCG
 751-800 GGGGAAAAC TGGACTGTTA CAACCAAAGG AACTTCGGCC AGGGCTAGGC
 801-850 TTCGTTACAT AGAATGCAGA TCATGTTATG TATACAAGTT ATATTTGTAT
 851-900 TAATTAATGA ATAAGGGGAT TGTGTATCCA TTAAGAATTA GGTGAAATAT
 901-950 TTCTGTTATT TGTCTTCTTG GGAAGAACCA ATAGCTCCTA TATATGAGGC
 951- 0 GCTTTTAAGT GATGAGGCTA CTGCATTGAT GAAAACGAAA TTTCTATCCA
 1001- 20 GAAATAAAAG TTCCTTGTCT

SEQUENCE 7

1- 50 CAGGTGCTCA AGCAGGAGTT TGTTATGGAA GGCAAGGGAA TGGATTACCA
 51-100 TCTCCAGCAG ATGTTGTGTC GCTATGCAAC CGAAACAACA TTCGTAGGAT
 101-150 GAGAATATAT GATCCTGACC AGCCAACTCT CGAAGCGCTT AGAGGCTCCA
 151-200 ACATTGAGCT CATGCTAGGT GTCCCGAATC CGGACCTTGA GAATGTTGCT
 201-250 GCTAGCCAAG CCAATNCAGA TACTTGGGTC CAAAACAATG TTAGGAACATA
 251-300 TGGTAATGTC AAGTTCAGGT ATATAGCAGT TGGAAATGAA GTTAGTCCCT
 301-350 TAAATGAAAA CTCTAAGTAT GTACCTGTCC TTCTCAACGC CATGCGAAAC
 351-400 ATTCAAACCTG CCATATCTGG TGCTGGTCTT GGAAACCAGA TCAAAGTCTC
 401-450 CACAGCTATT GAAACTGGAC TTACTACAGA CACTTCTCCT CCATCAAATG
 451-500 GGAGATTCAA AGATGATGTT CGACAGTTTA TAGAGCCTAT CATCAACTTC
 501-550 CTAGTGACCA ATCGCGCCCC TTTGCTTGTC AACCTTTATC CTTACTTTGC
 551-600 AATAGCAAAC AATGCAGATA TTAAGCTTGA GTATGCACTT TTTACATCCT
 601-650 CTGAAGTTGT TGTAATGAT AACGGAAGAG GATACCGAAA CCTTTTTGAT
 651-700 GCCATCTTAG ATGCCACATA CTCGGCCCTT GAAAAGGCTA GTGGCTCGTC
 701-750 TTTGGAGATT GTTGTATCAG AGAGTGGTTG GCCTTCAGCT GGAGCAGGAC
 751-800 AATTAACATC CATTGACAAT GCCAGGACTT ATAACAACAA CTTGATTAGT
 801-850 CACGTGAAGG GAGGGAGTCC CAAAAGGCTT CCGGTCCAAT AGAGACCTAC
 851-900 GTTTTCGCTC TGTTTGATGA AGATCAGAAA GACCCTGAAA TTGAGAAGCA
 901-950 TTTTGGACTA TTTTCAGCAA ACATGCAACC AAAGTACCAG ATCAGTTTTA
 951- 0 ACTAGTTAAA AGCAAGAGGA GAGCATTAAT AGGAATAAGG ACTTTCCTTT
 1001- 50 GTATGAAGAG AAAGTAGTCC ATTGGCACTA TGTACTGAAA CTATATATCA
 1051-100 TGCTCATAAA GAAAGCAGTT ATTACAATAA TGAAACACTT ACAAGAAAAG
 1101-107 CCATCAA

SEQUENCE 8

λ tobchr PR1013

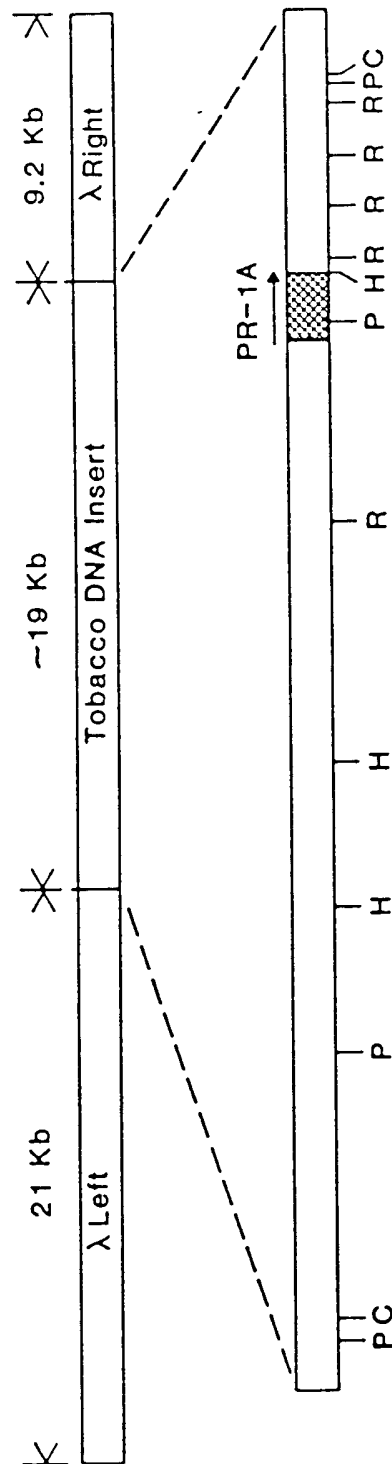


FIGURE 1

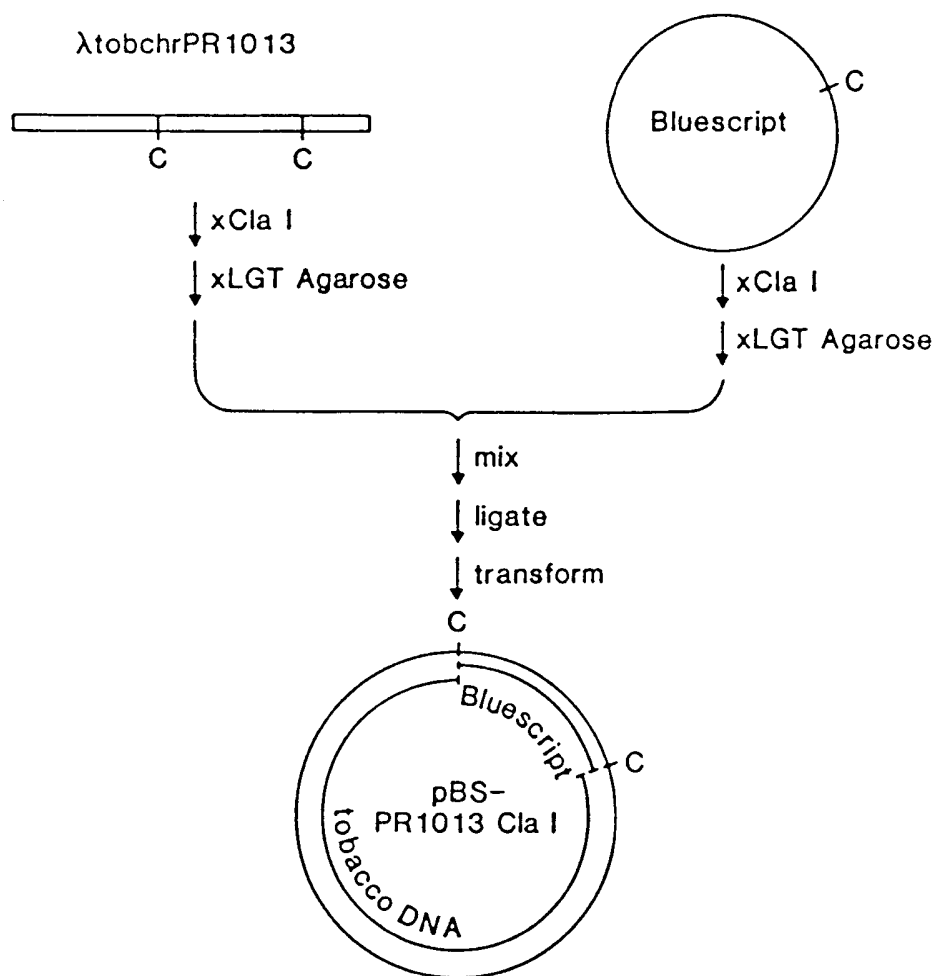
Construction of pBS-PR1013 *cl*a From λ tobchr PR1013

FIGURE 2

Construction of pBS-PR1013 Eco
From λ tobchr PR1013

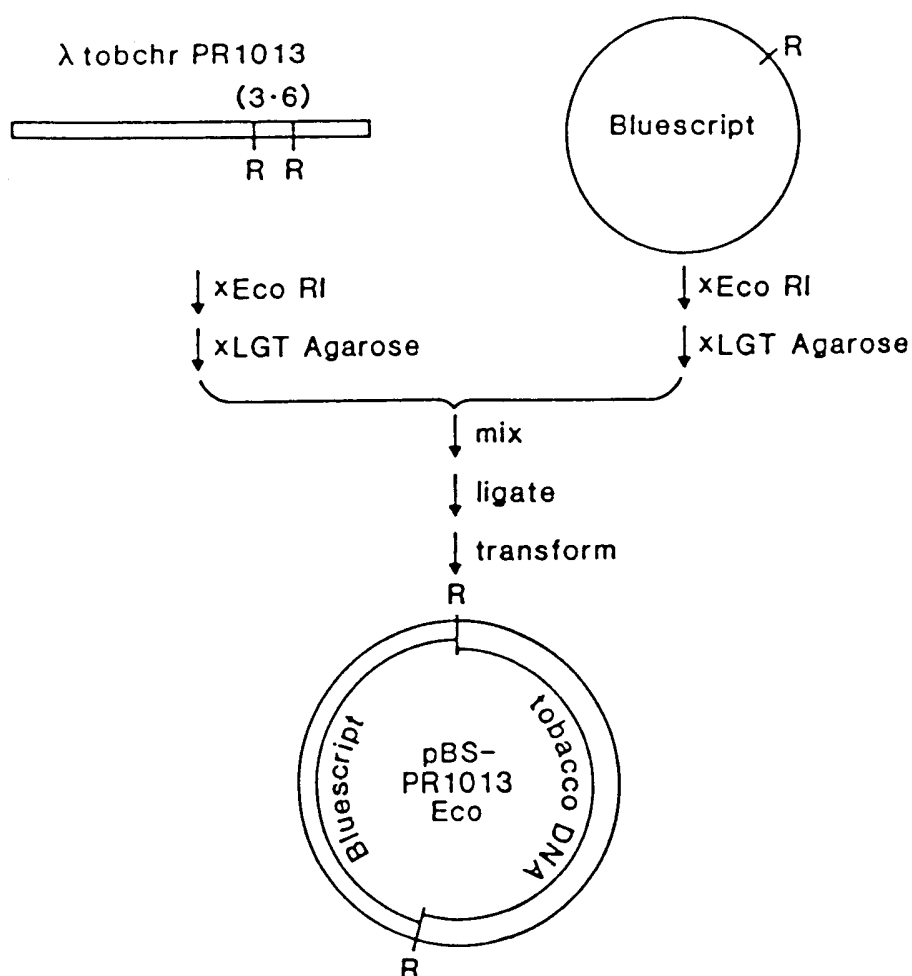


FIGURE 3

Construction of pBS-PR1013 Eco
From pBS-PR1013 Cla

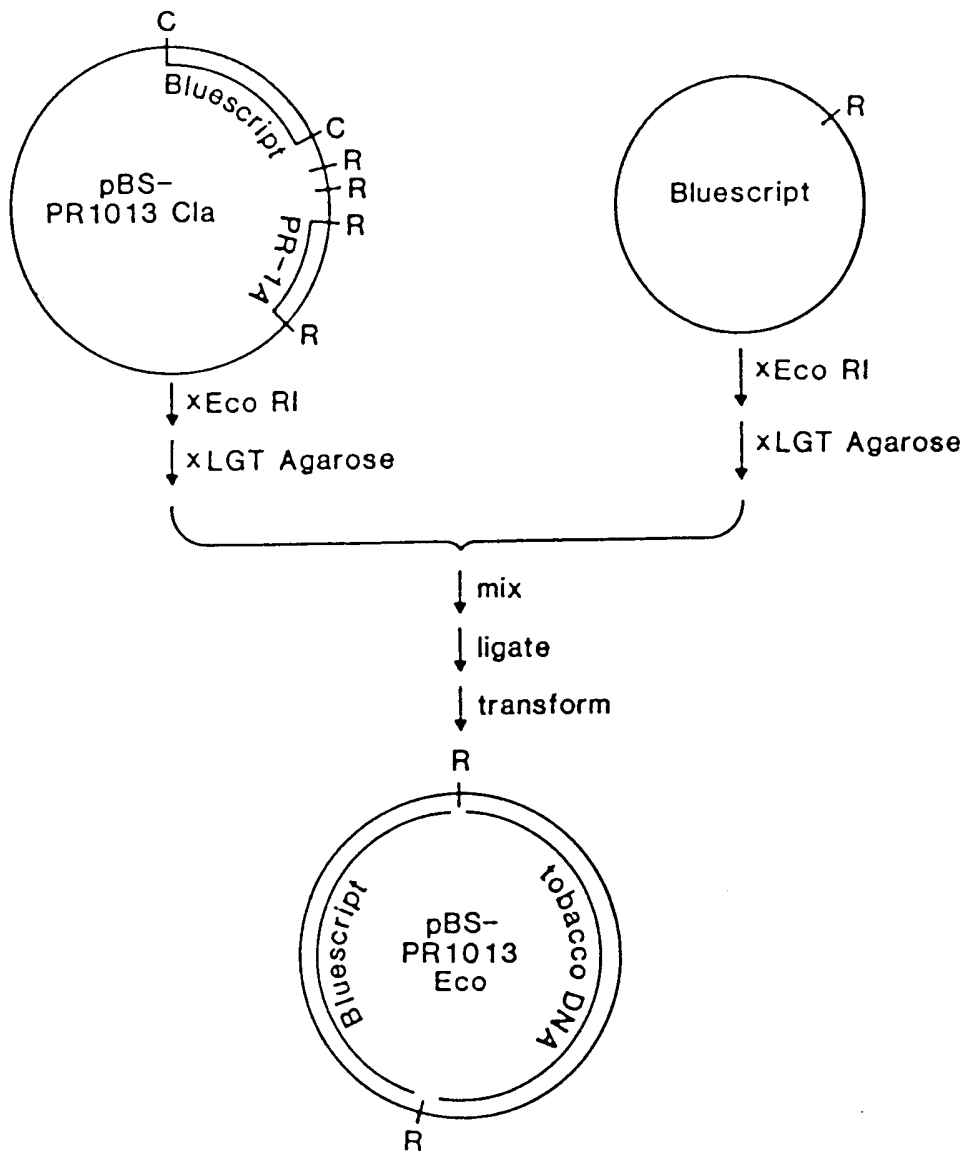


FIGURE 4

Construction of pBS-PR1013 Eco Δ Pst
From pBS -PR1013 Eco

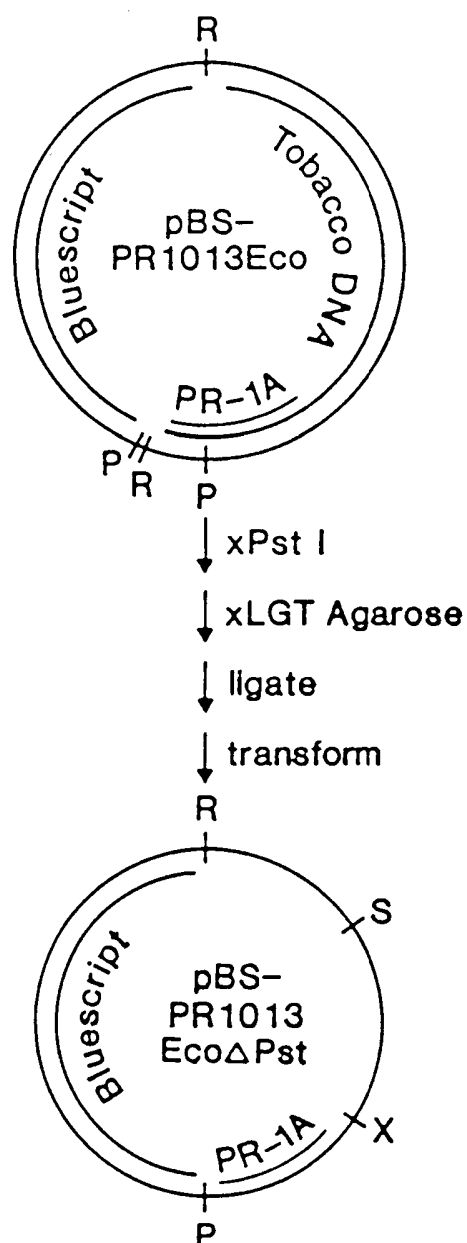


FIGURE 5

Handwritten signature and date: 1/10/83

Construction of pBS-PR1013 Eco Δ Pst Δ Xho
From pBS-PR1013 Eco Δ Pst

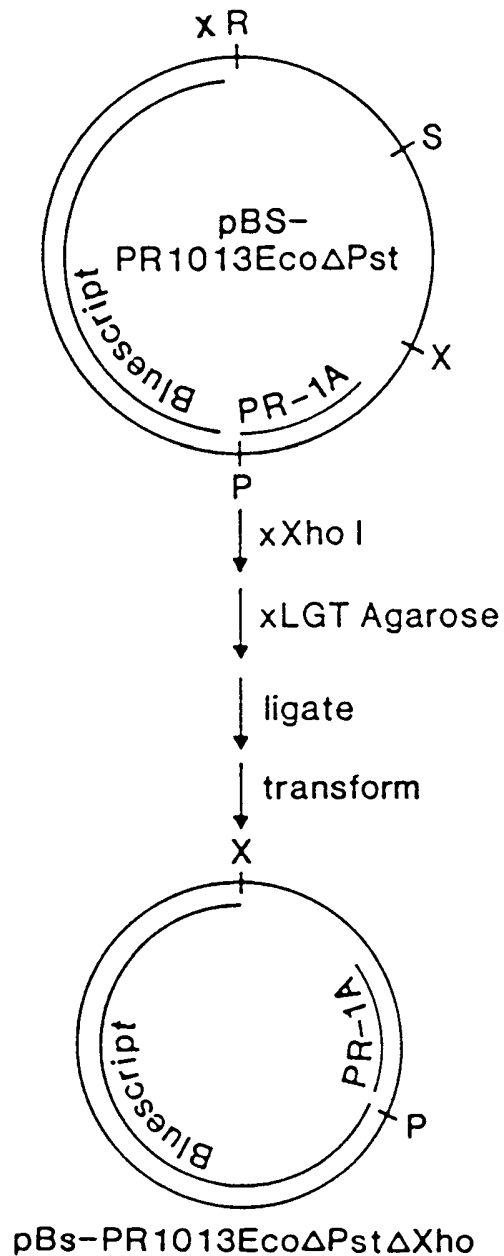


FIGURE 6

Construction of pCIB270

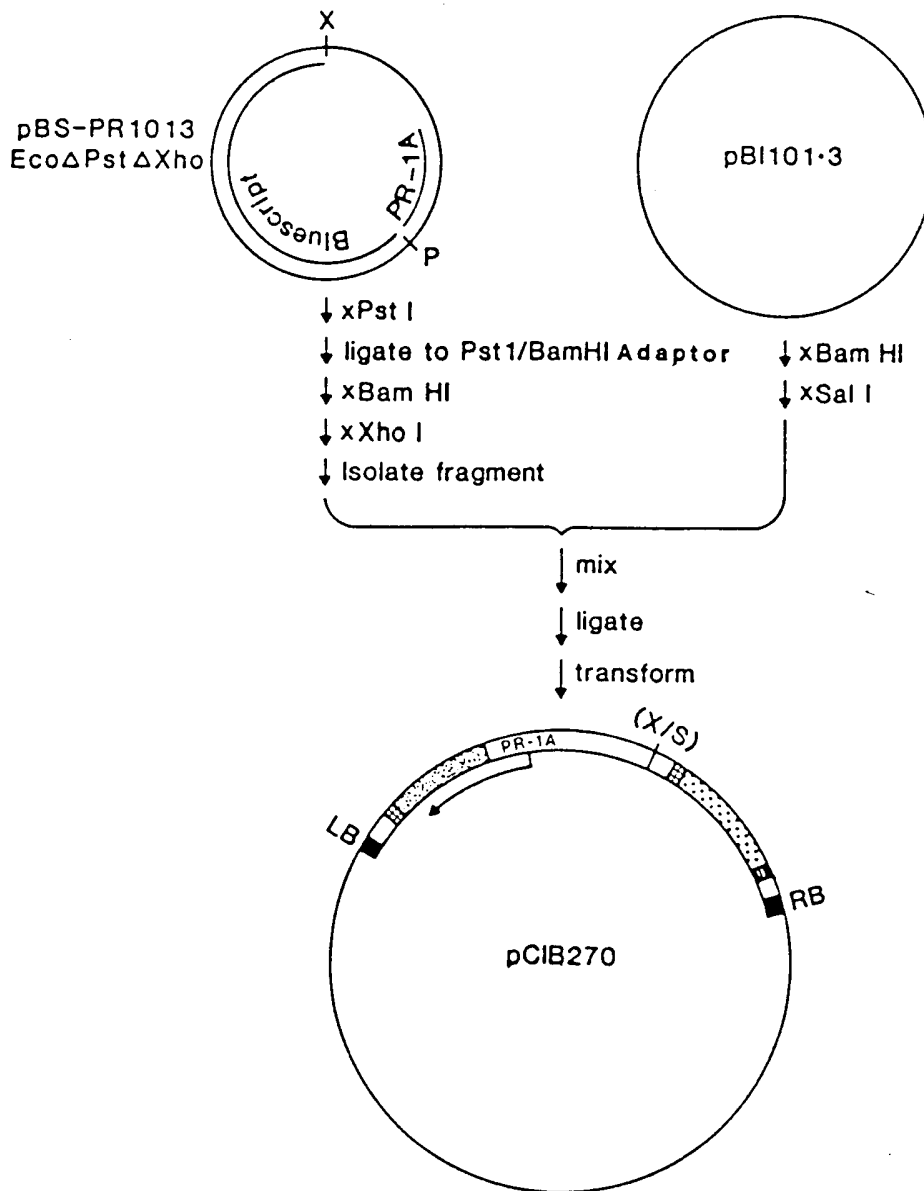


FIGURE 7

Construction of M13 mp18-PR1013 Eco Δ Pst Δ Xho
and M13mp19-PR1013 Eco Δ Pst Δ Xho

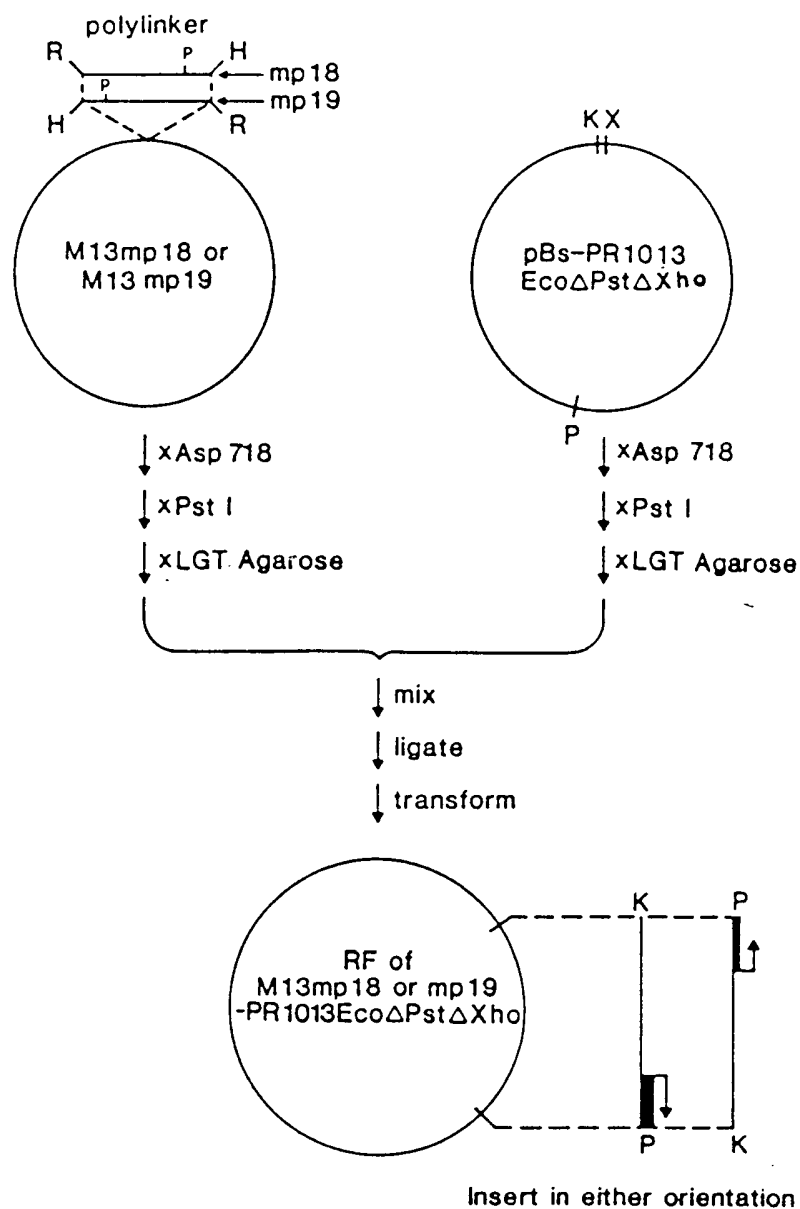


FIGURE 8

Conversion of ATG to Nco I Site

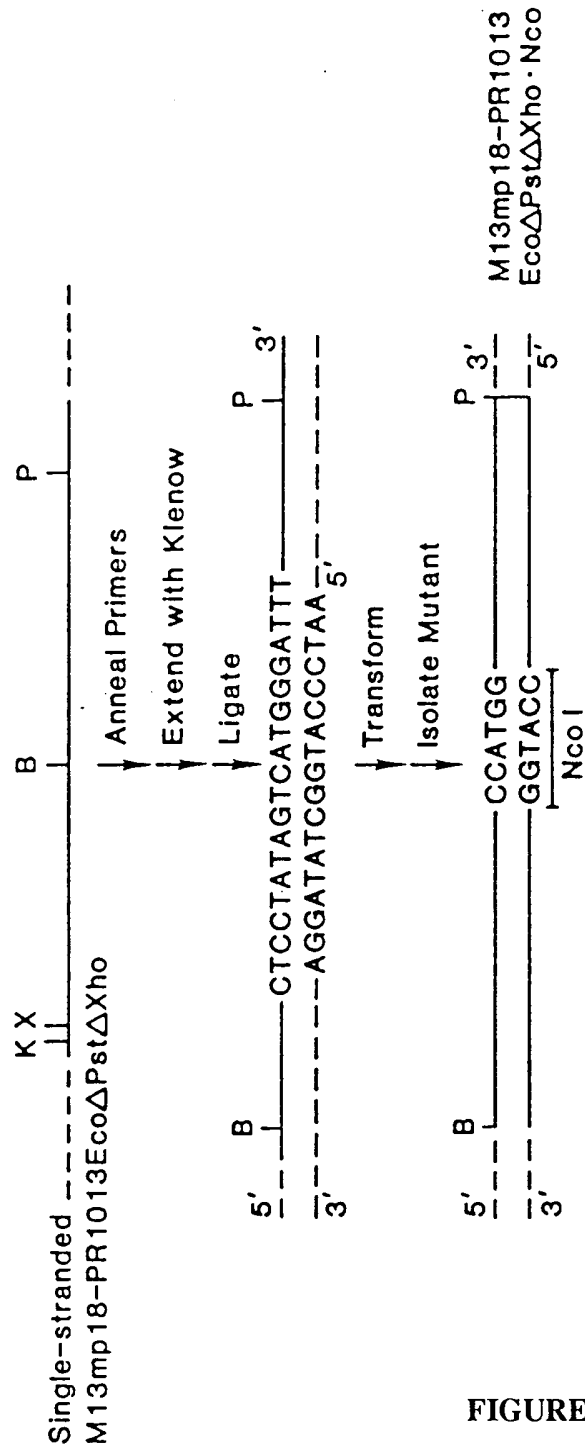


FIGURE 9

Construction of pCIB268

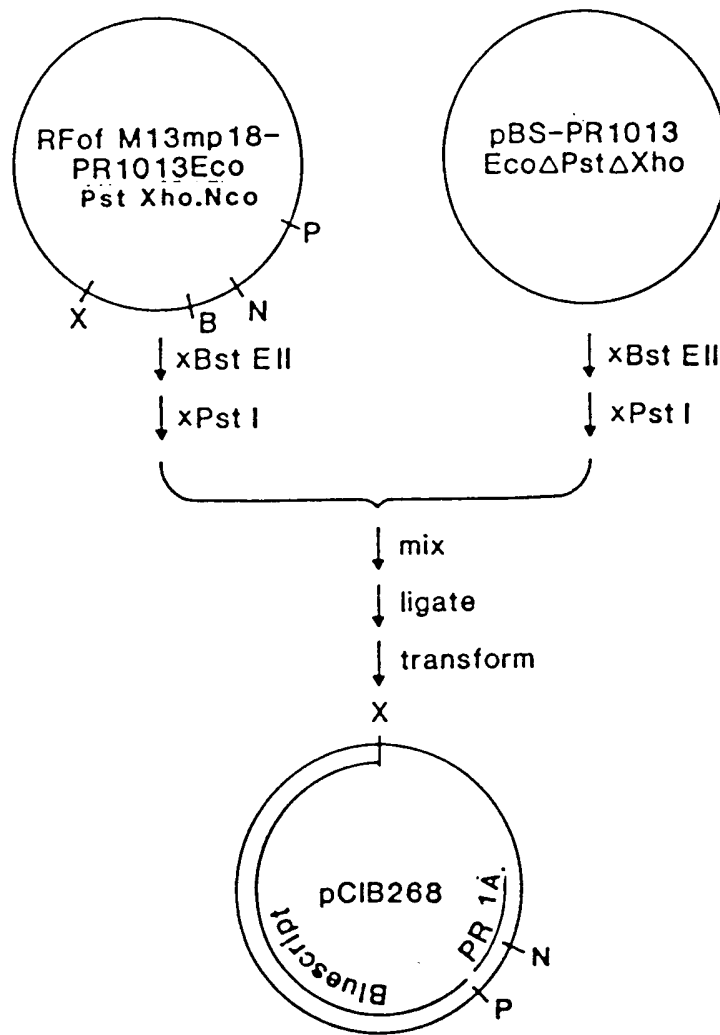


FIGURE 10

[Handwritten signature]
2000-01-10
2000-01-10

Construction of pCIB269

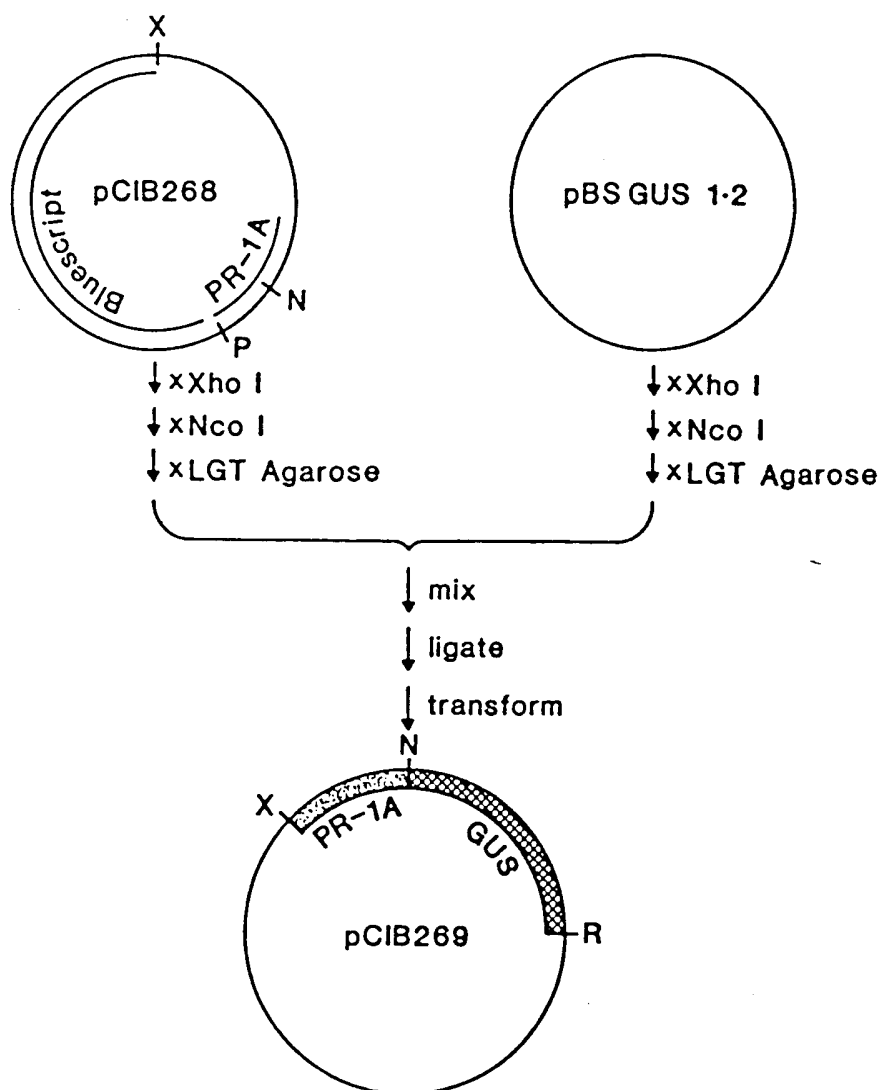


FIGURE 11

Construction of pBS GUS 1-2

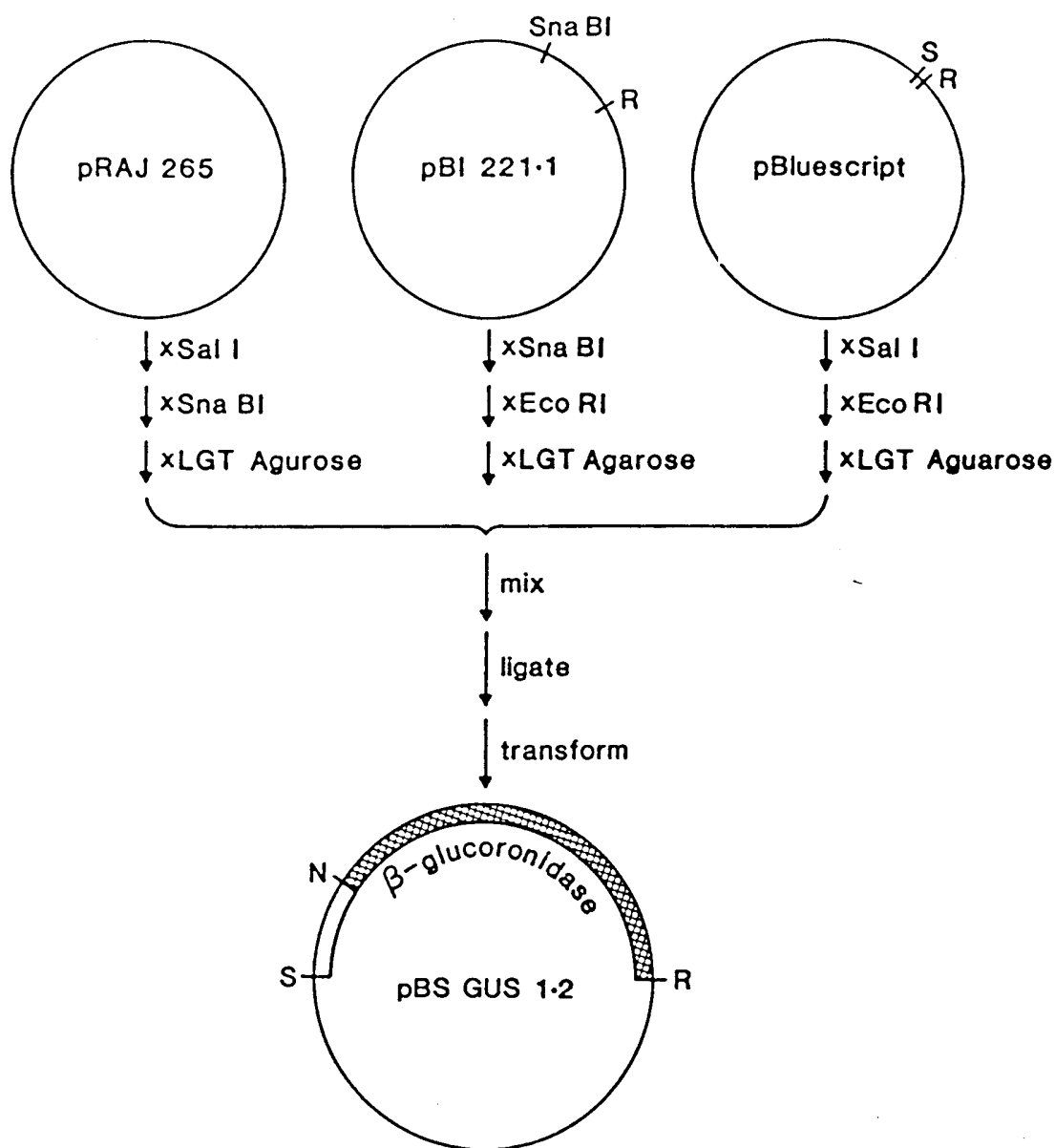


FIGURE 12

Construction of pCIB271

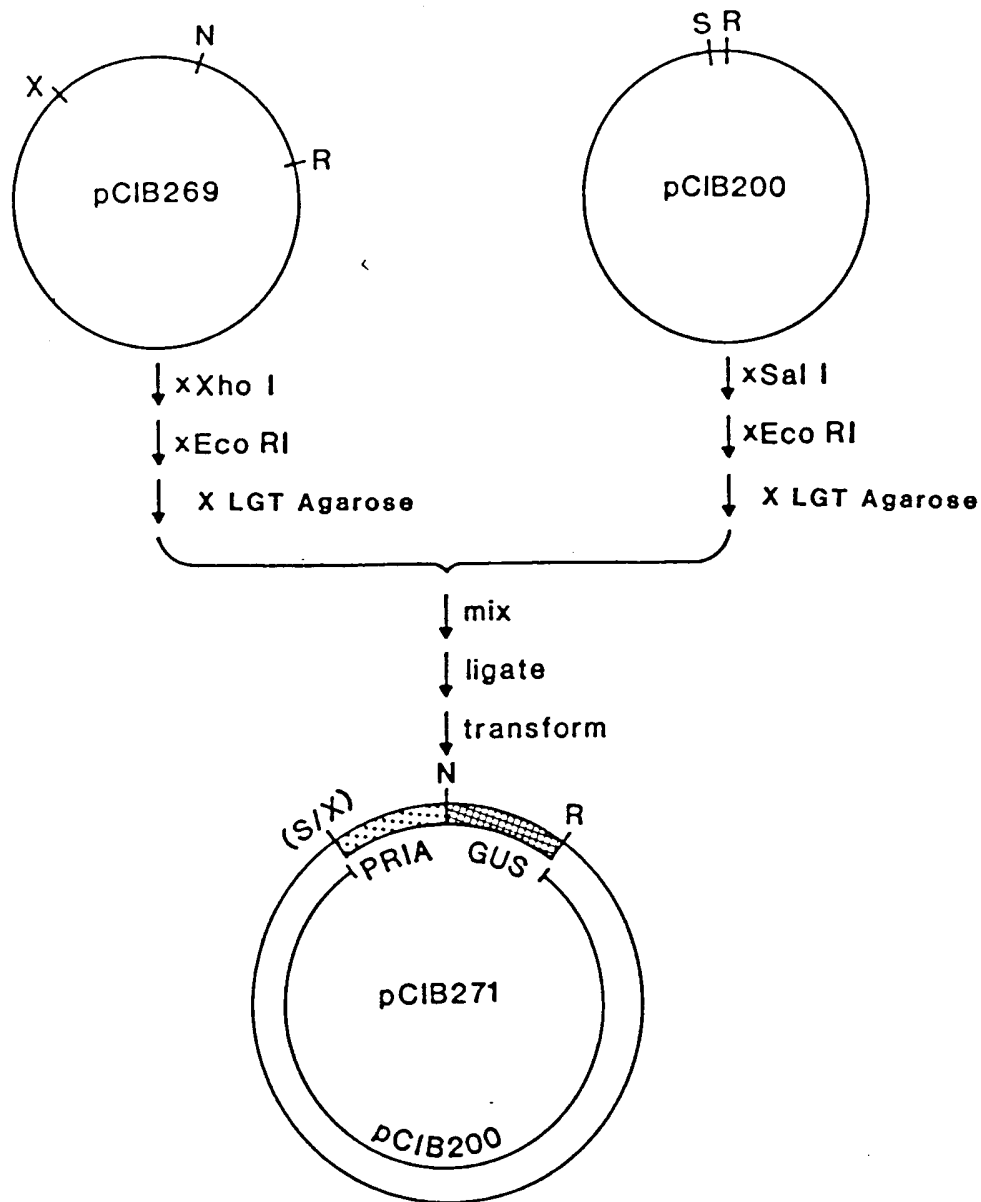


FIGURE 13

JUD. Evan K. [unclear]
 Assistant Payroll [unclear]
 1000 BROADWAY, 1, 10003

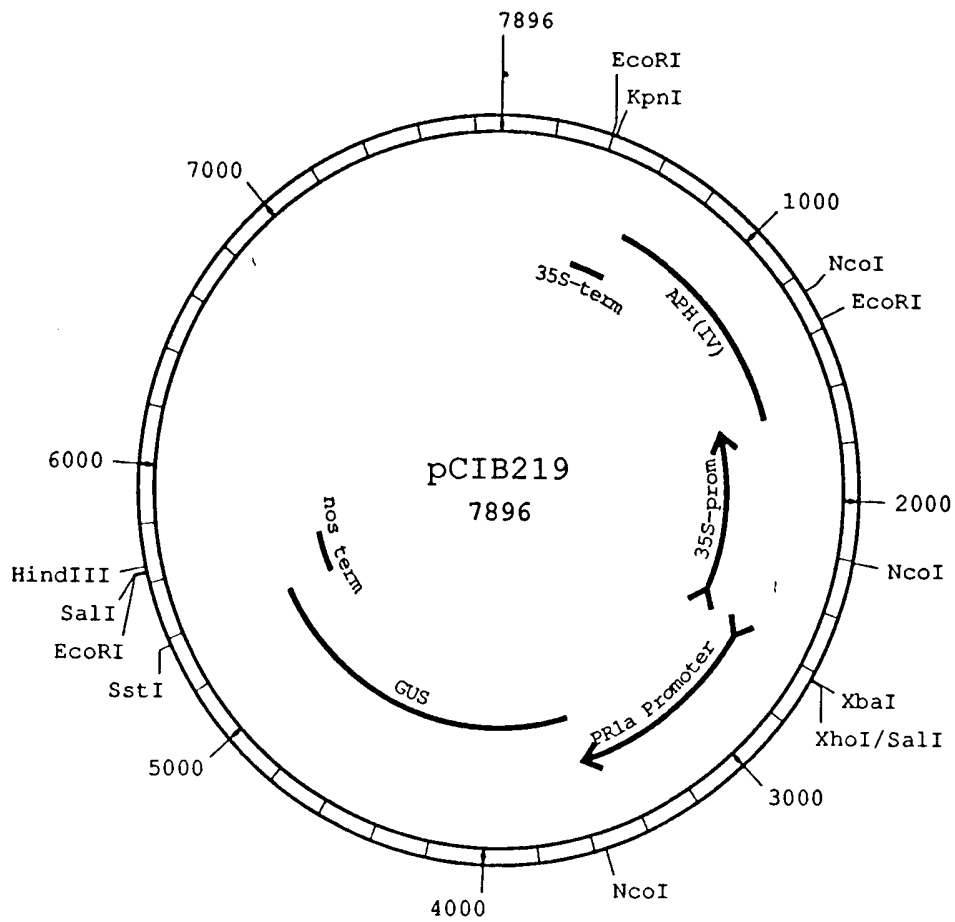
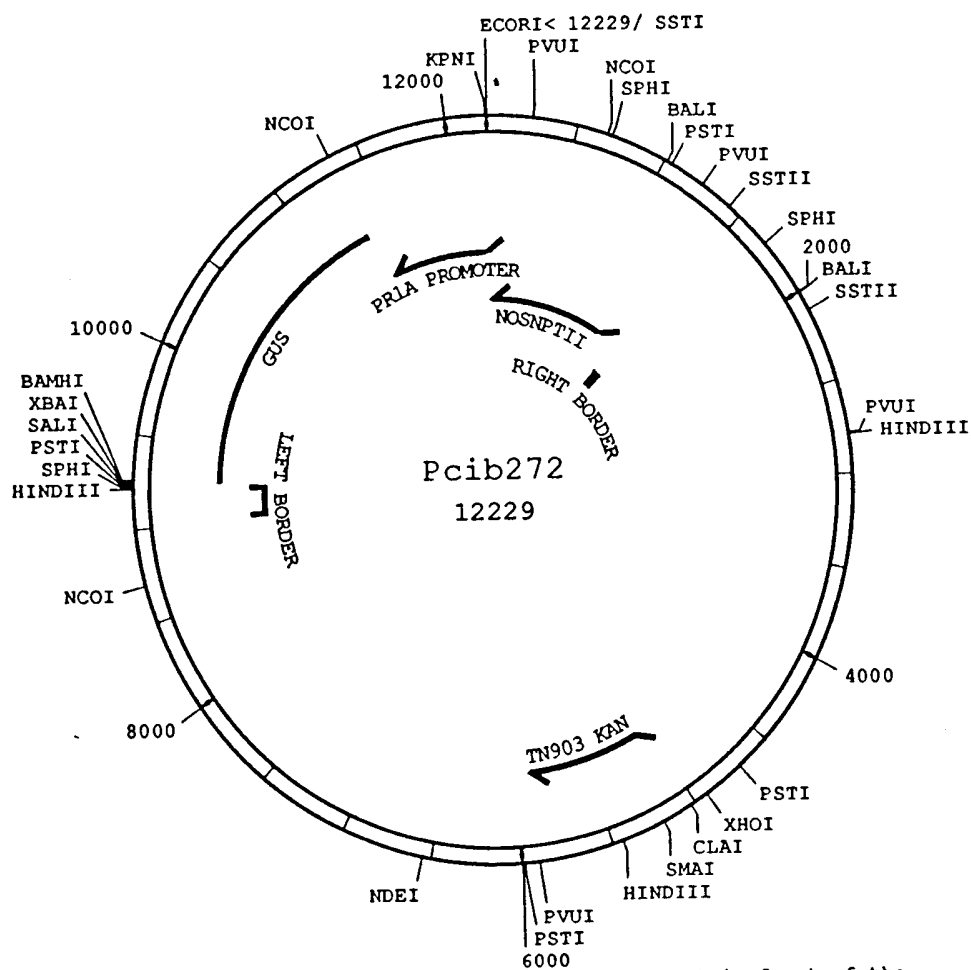


FIGURE 14

JUD. [Signature]
[Illegible text]
[Illegible text]



5' deletion of PR1A promoter sequence (AluI-NcoI) in front of the Gus gene in pCIB200.

FIGURE 15

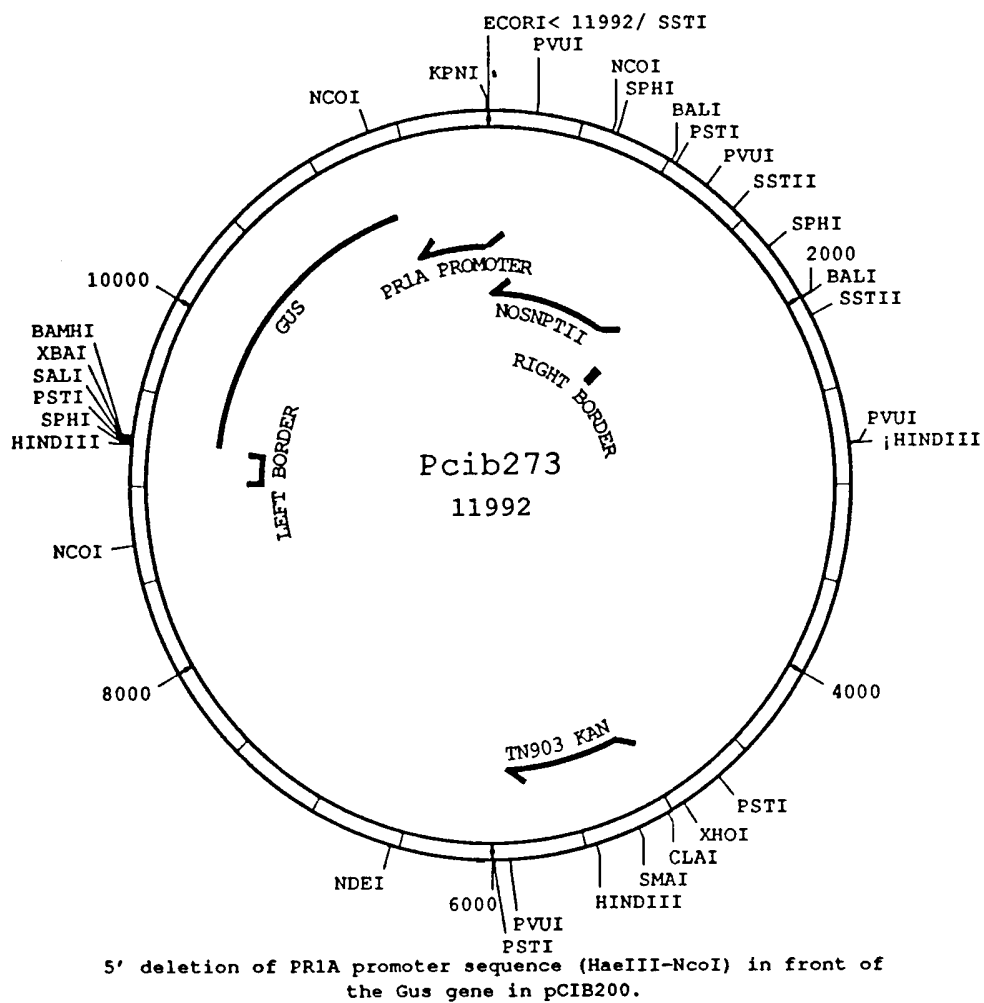


FIGURE 16

Handwritten signature and date: 10/10/90

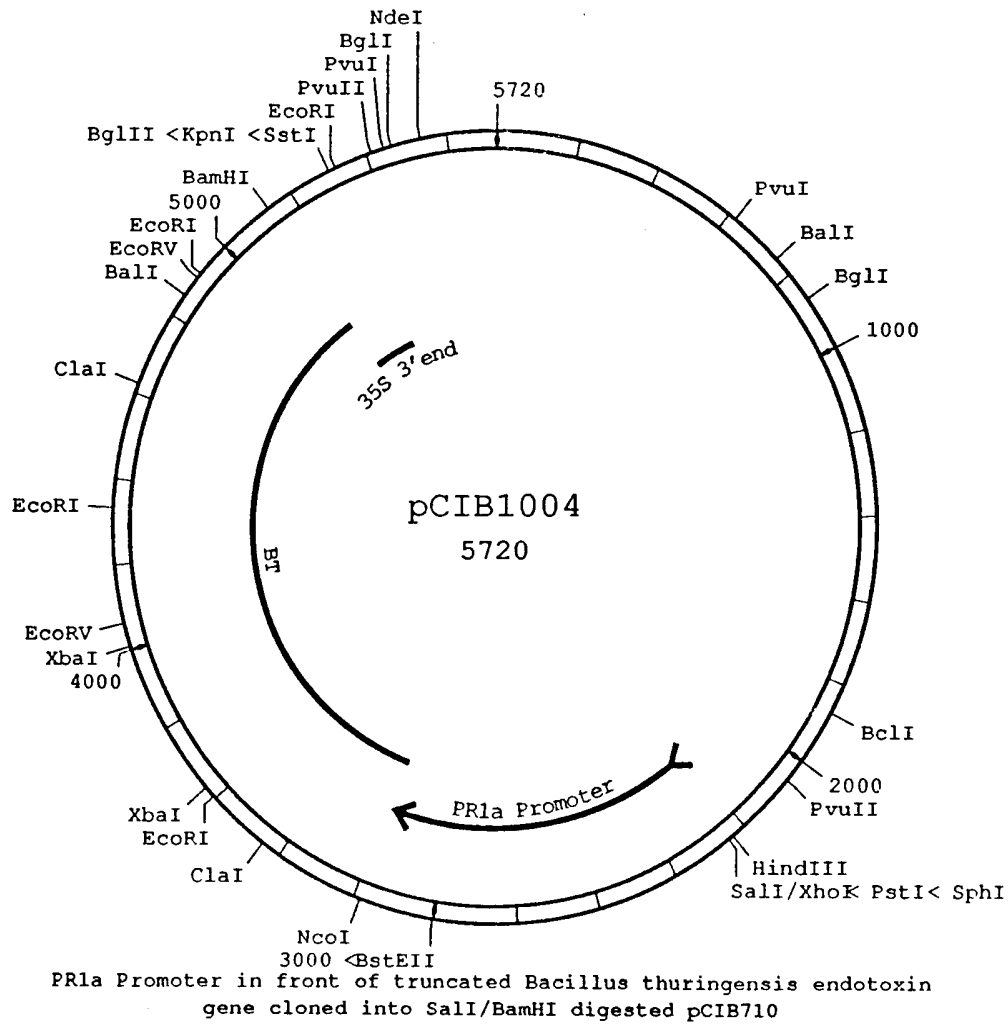
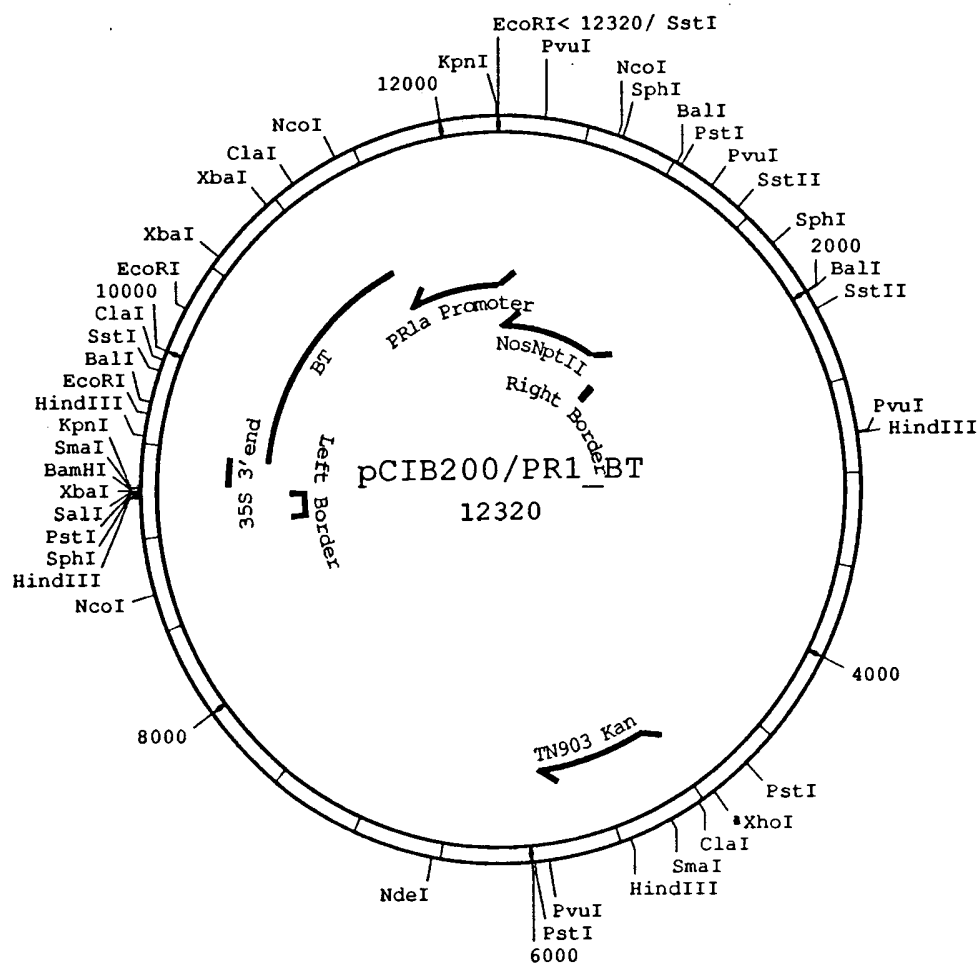


FIGURE 17



Promoter sequence from PR1a gene in front of a truncated *Bacillus thuringiensis* endotoxin gene

FIGURE 18

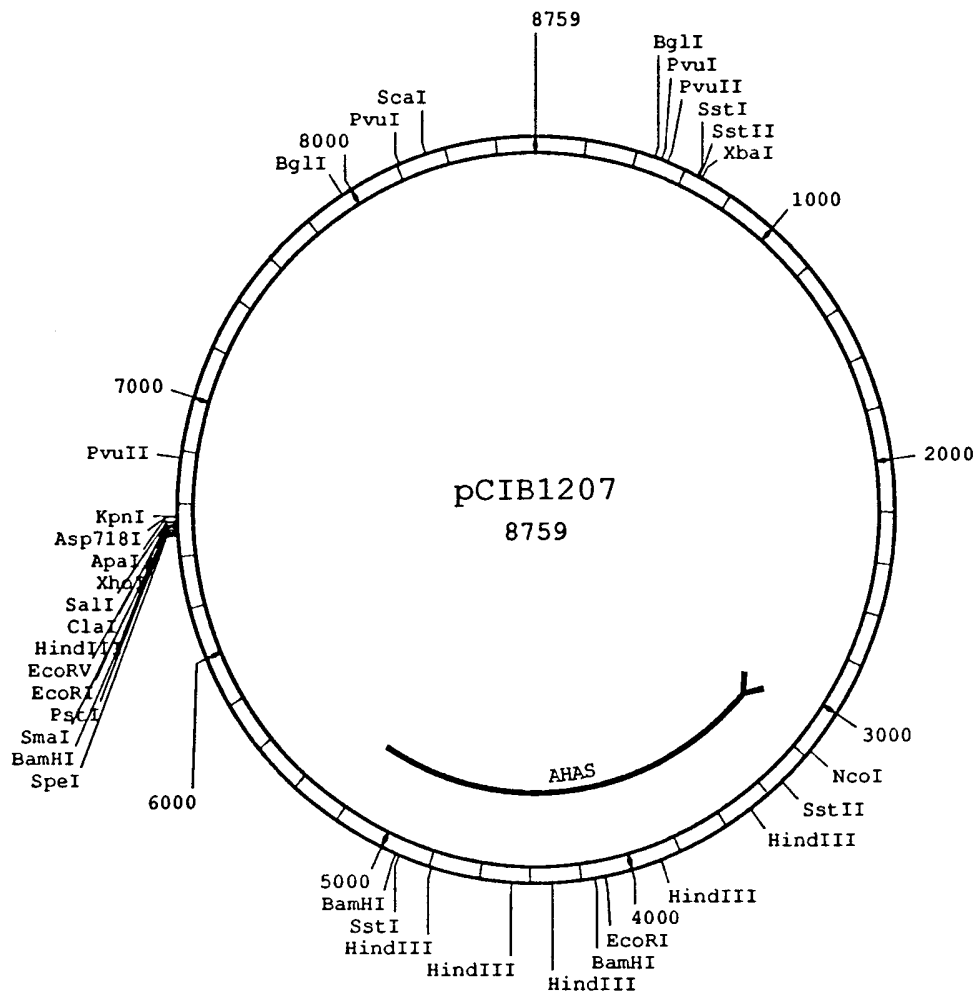


FIGURE 19

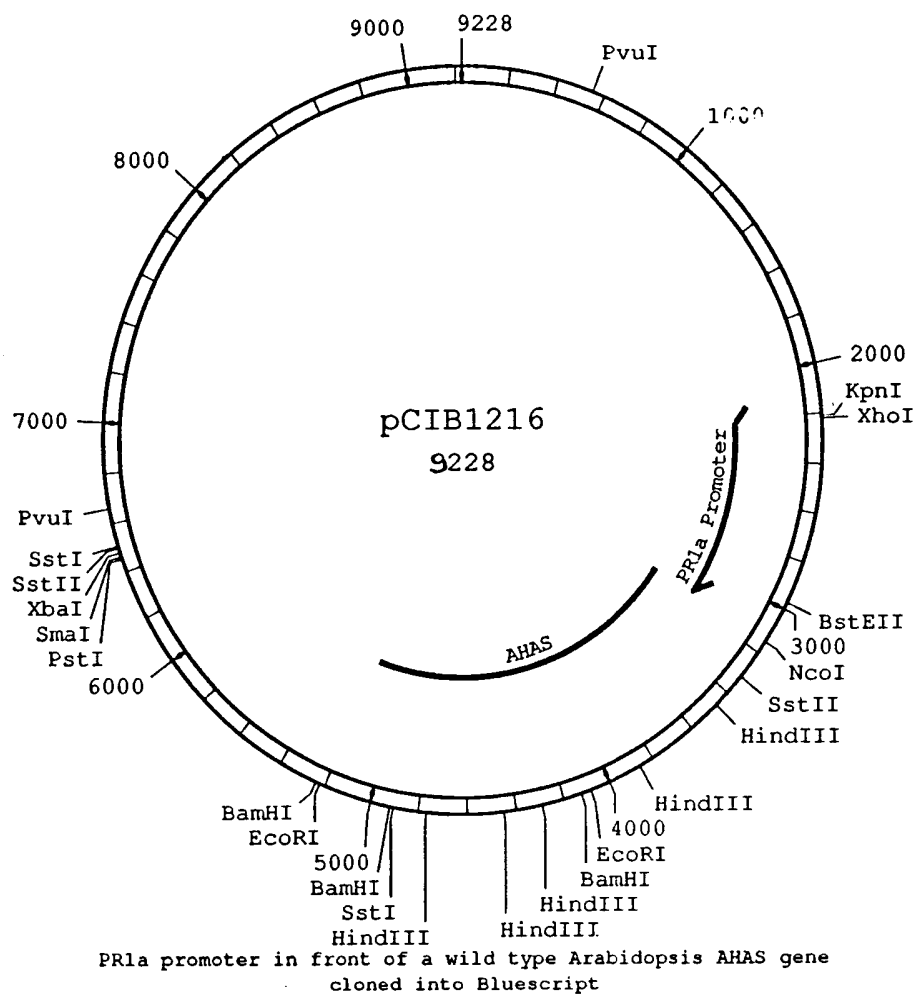


FIGURE 20

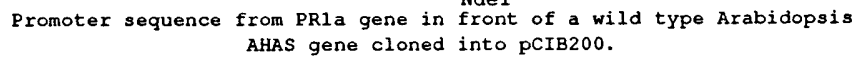


FIGURE 21

JUDr. ~~IVAN~~ KOREČEK
 Advokát, Pateček 1. 10
 PRAHA 1

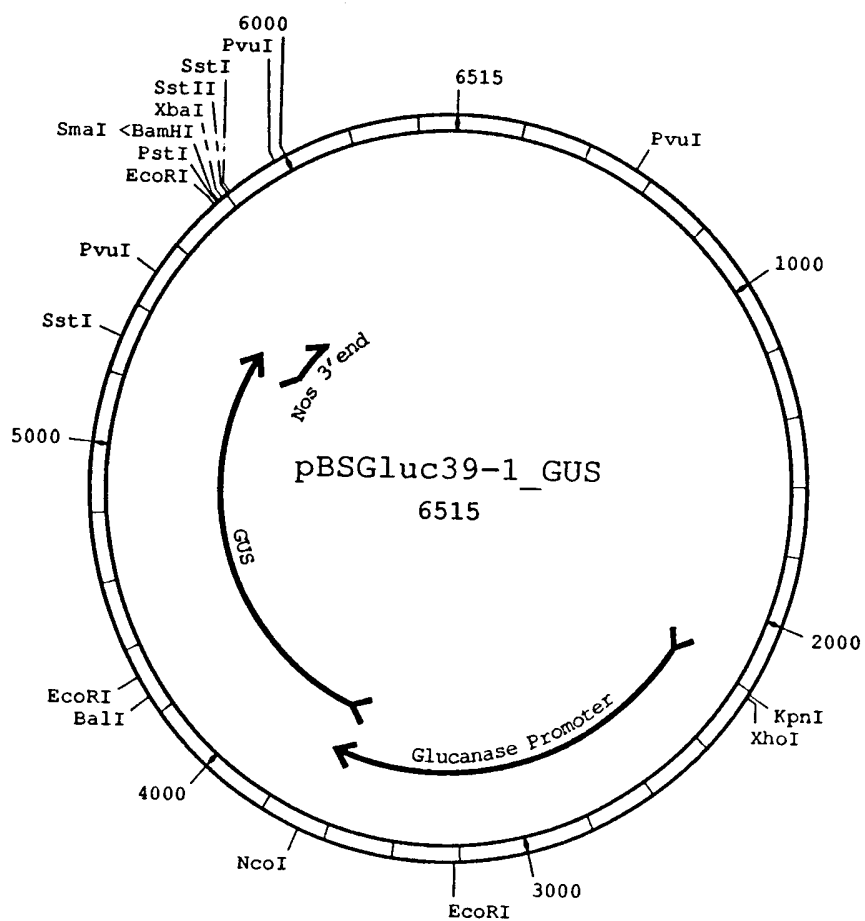


FIGURE 22

RECEIVED
JAN 11 1994
FBI - NEW YORK
100-100000-100000

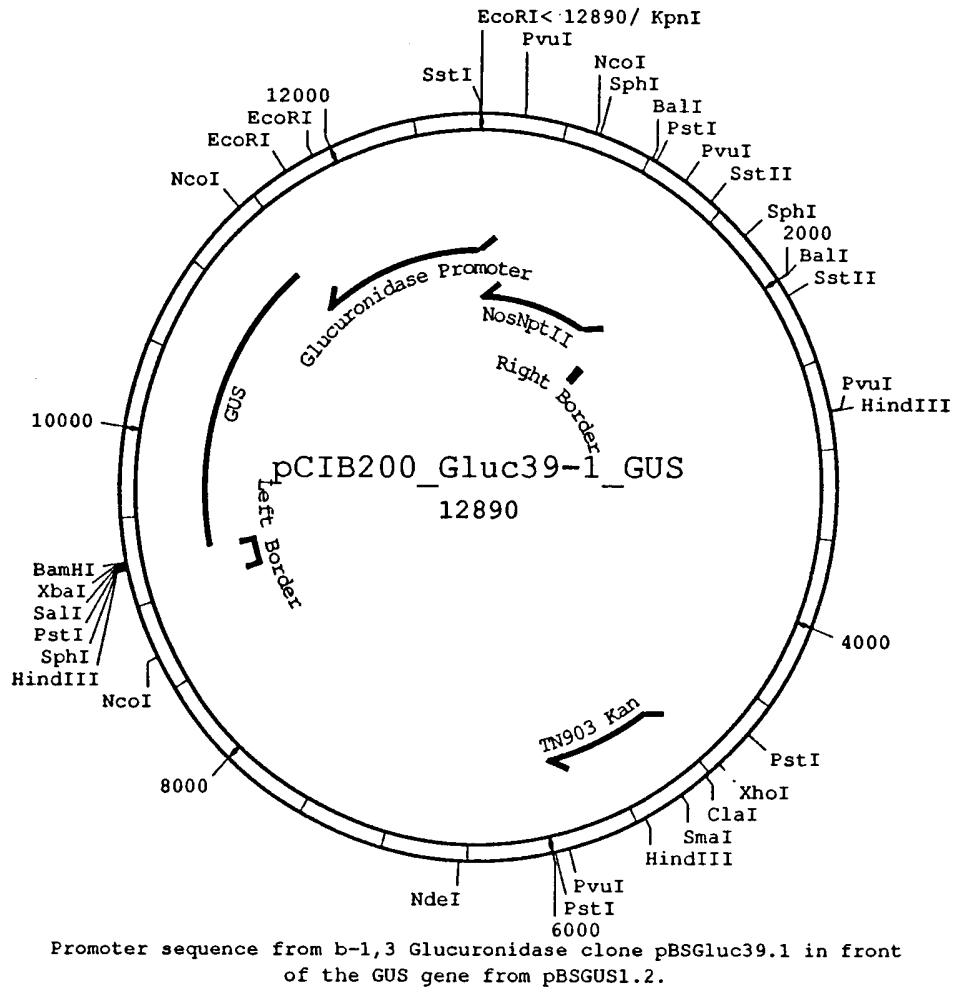
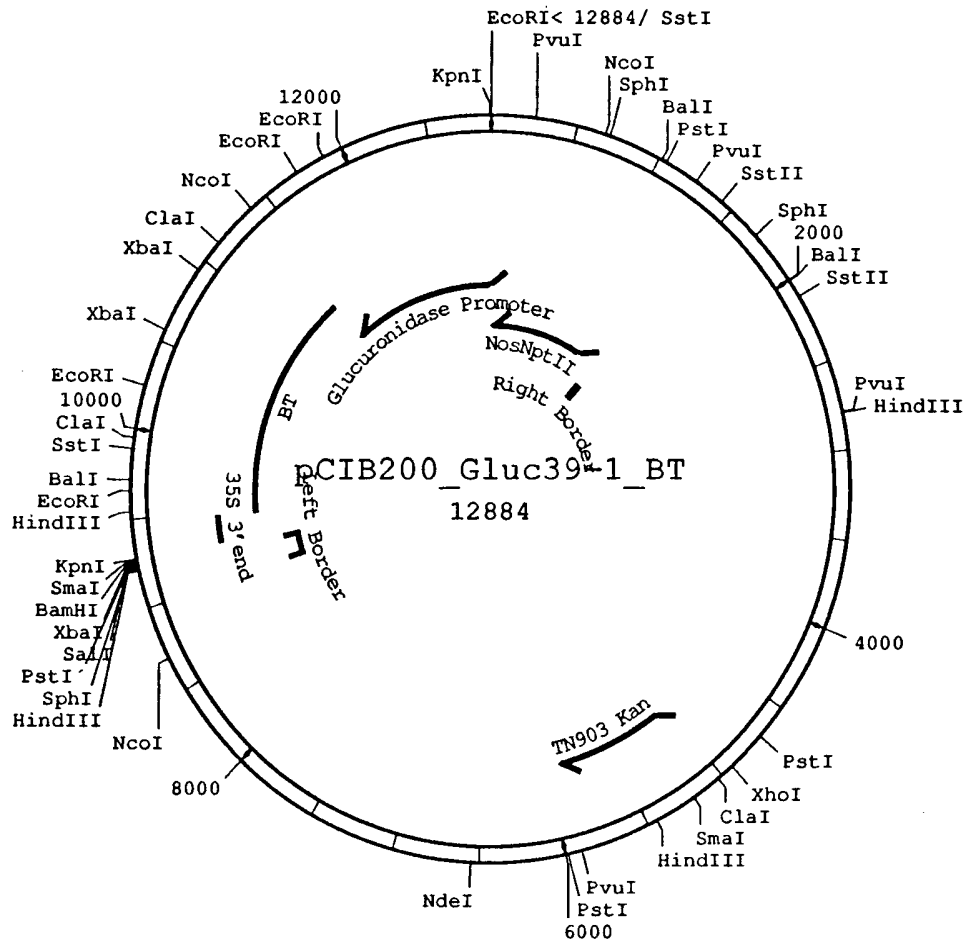


FIGURE 23



Promoter sequence from b-1,3 Glucuronidase clone pBSGluc39.1 in front of a truncated *Bacillus thuringiensis* endotoxin gene

FIGURE 24

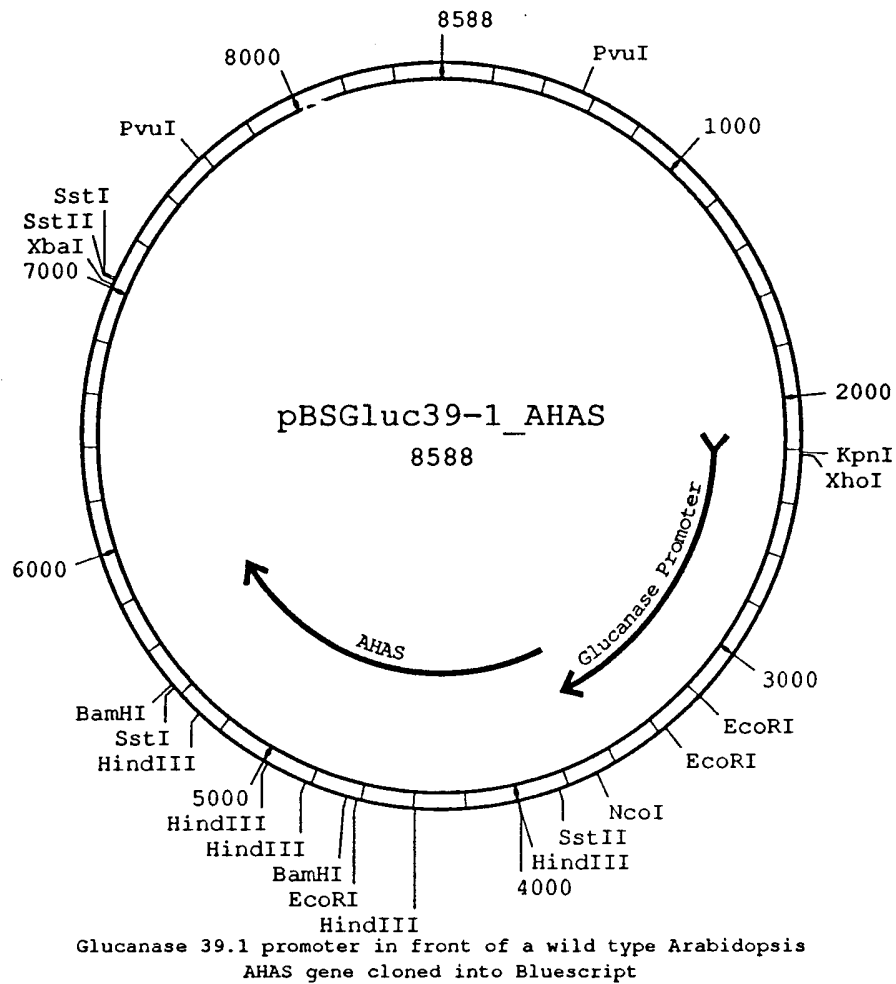


FIGURE 25

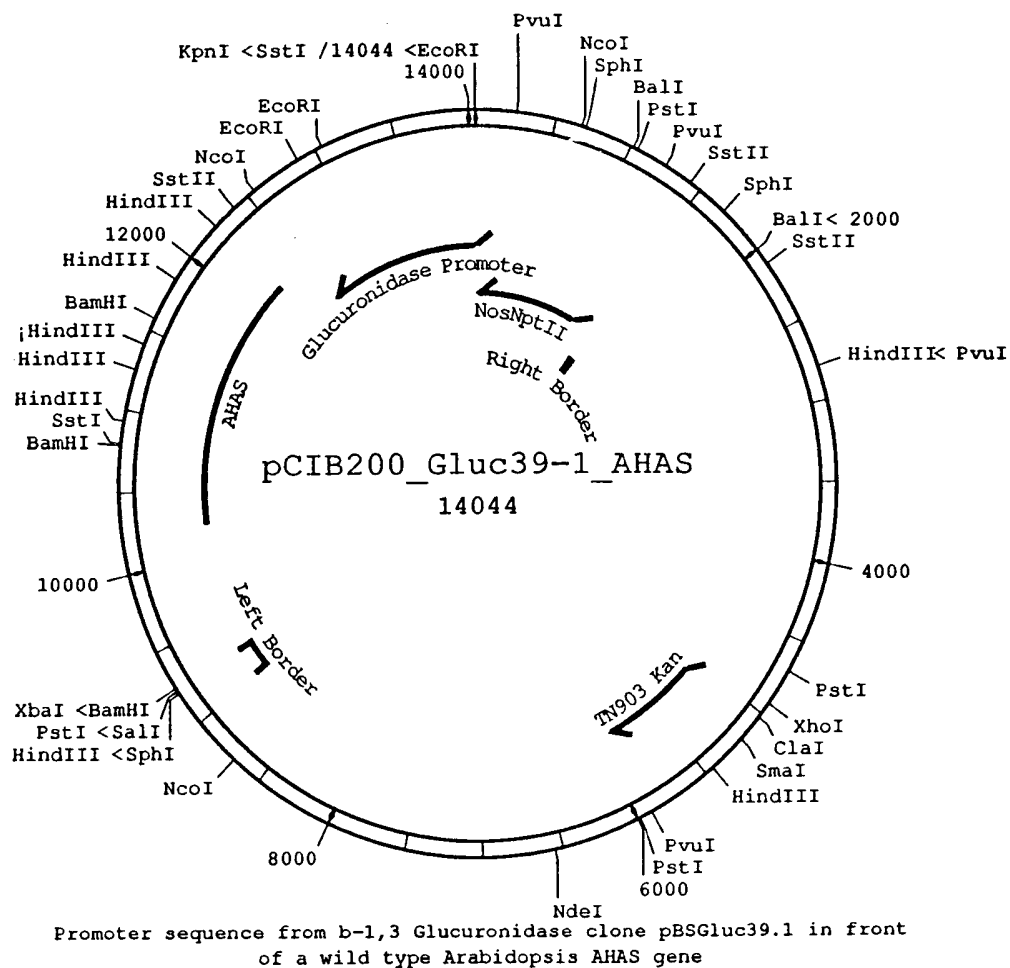


FIGURE 26

[illegible]

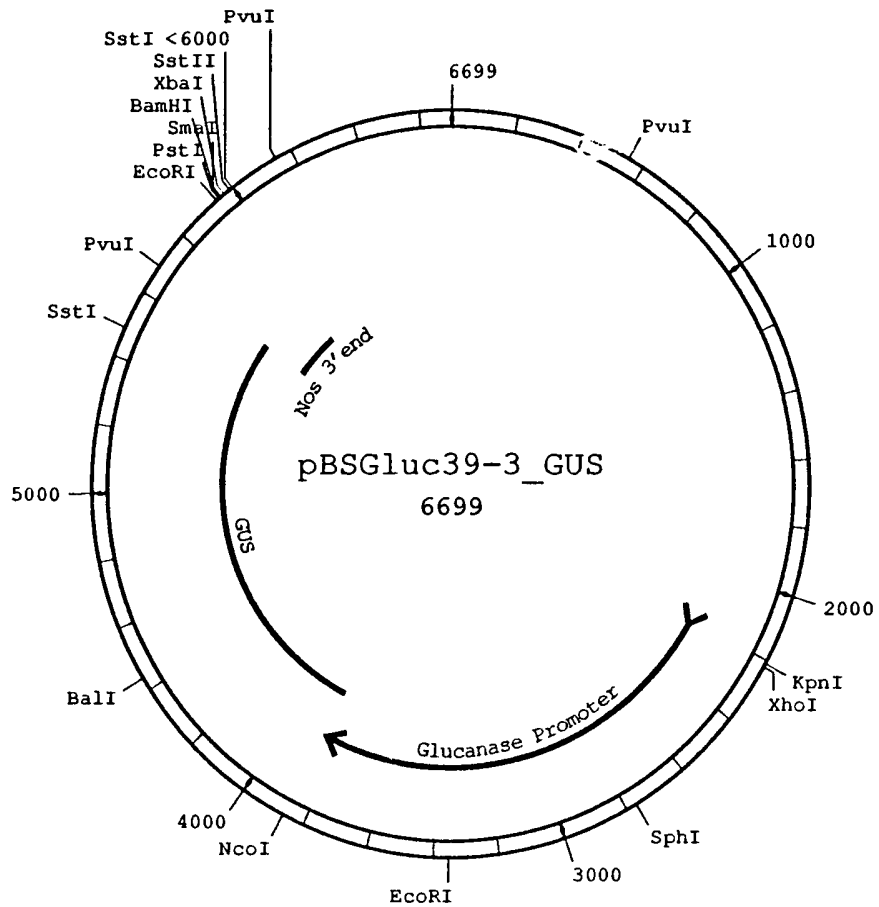
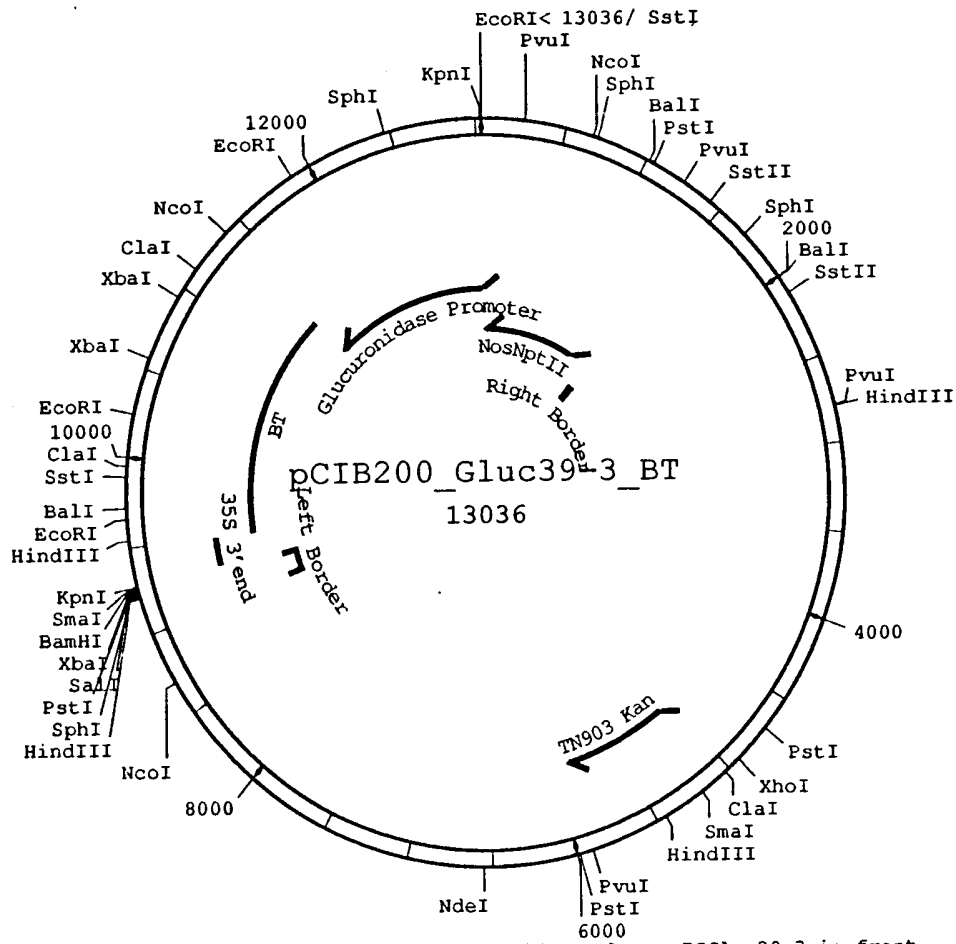


FIGURE 27





Promoter sequence from b-1,3 Glucuronidase clone pBSGluc39.3 in front of a truncated *Bacillus thuringiensis* endotoxin gene

FIGURE 29

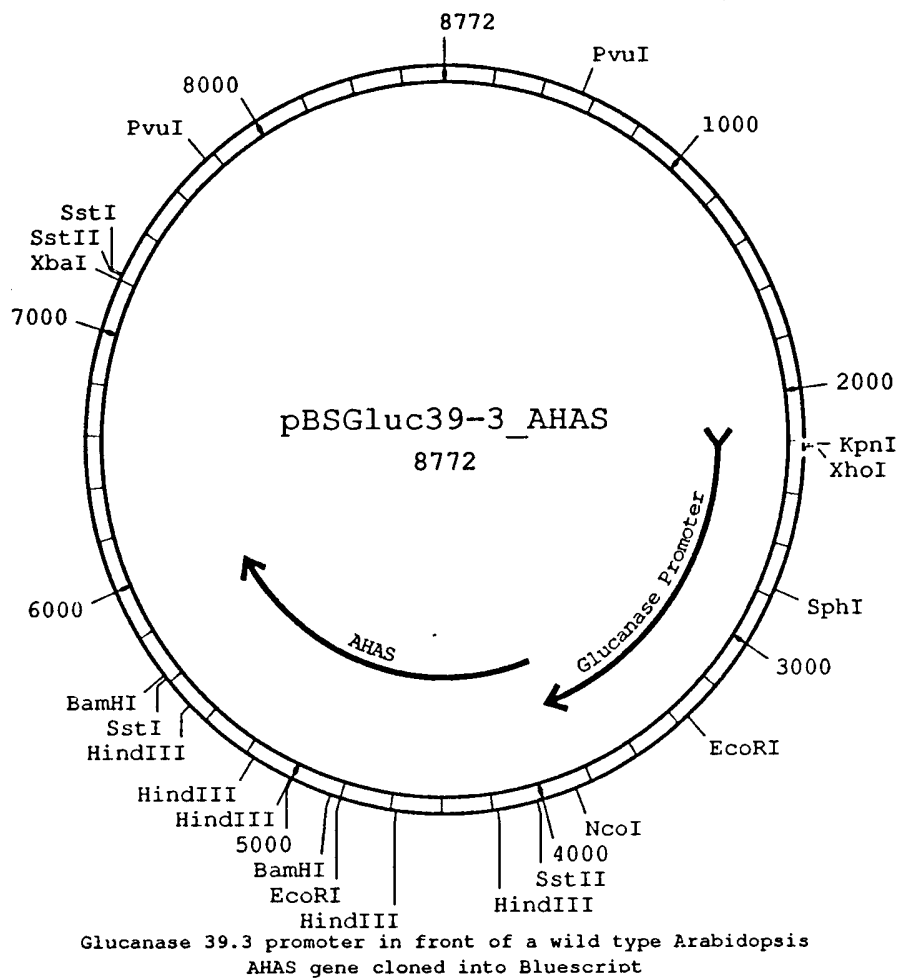


FIGURE 30

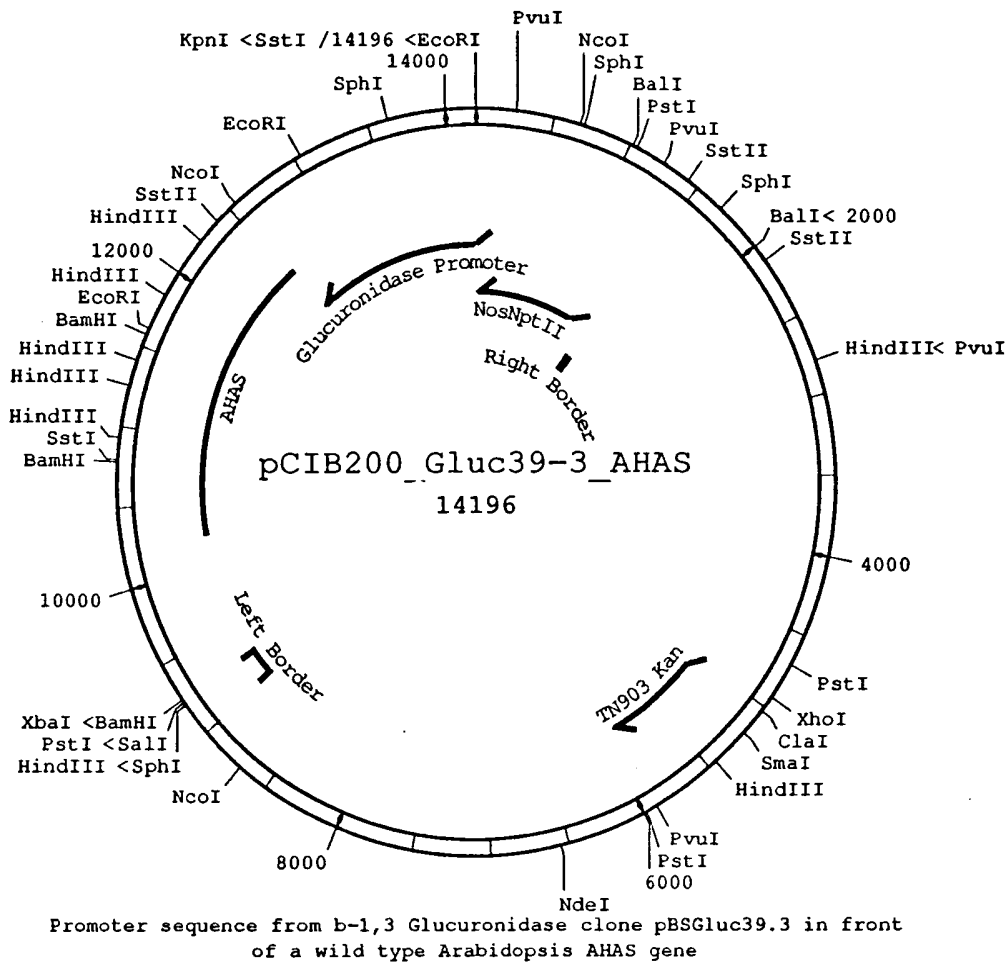


FIGURE 31

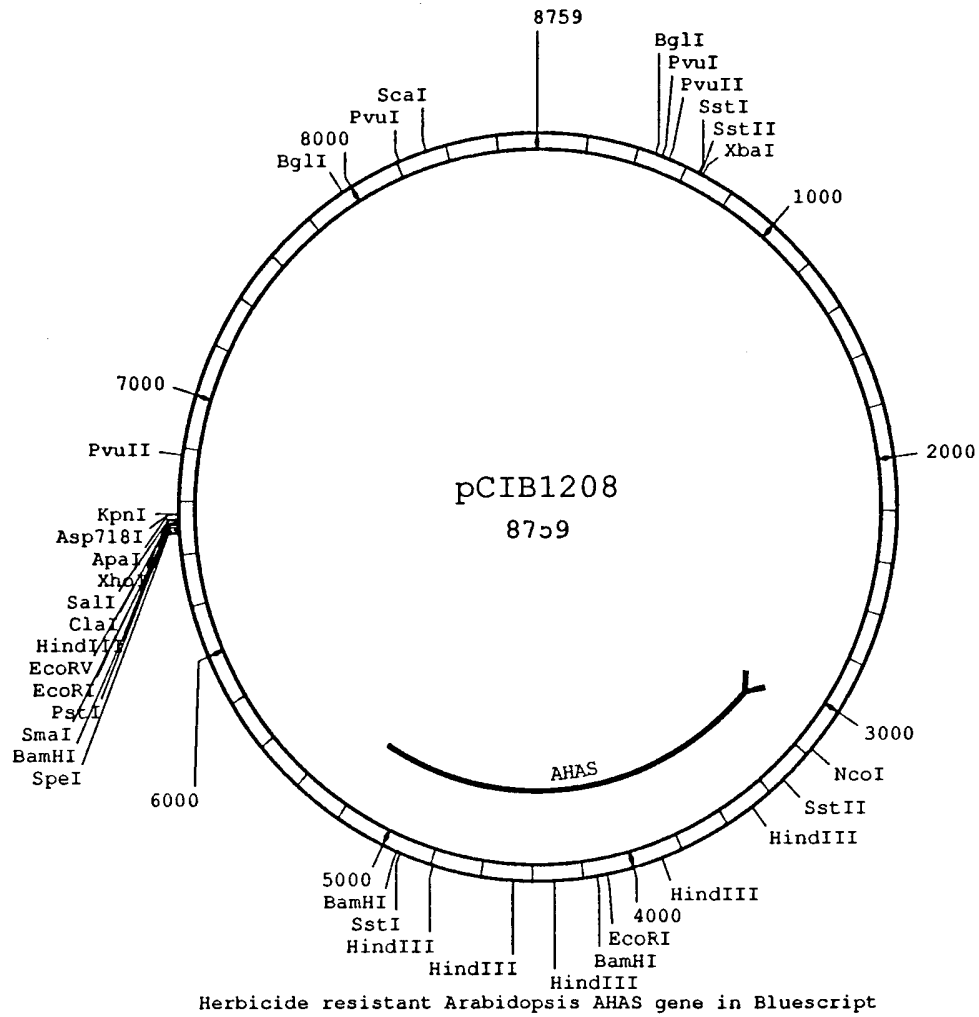


FIGURE 32

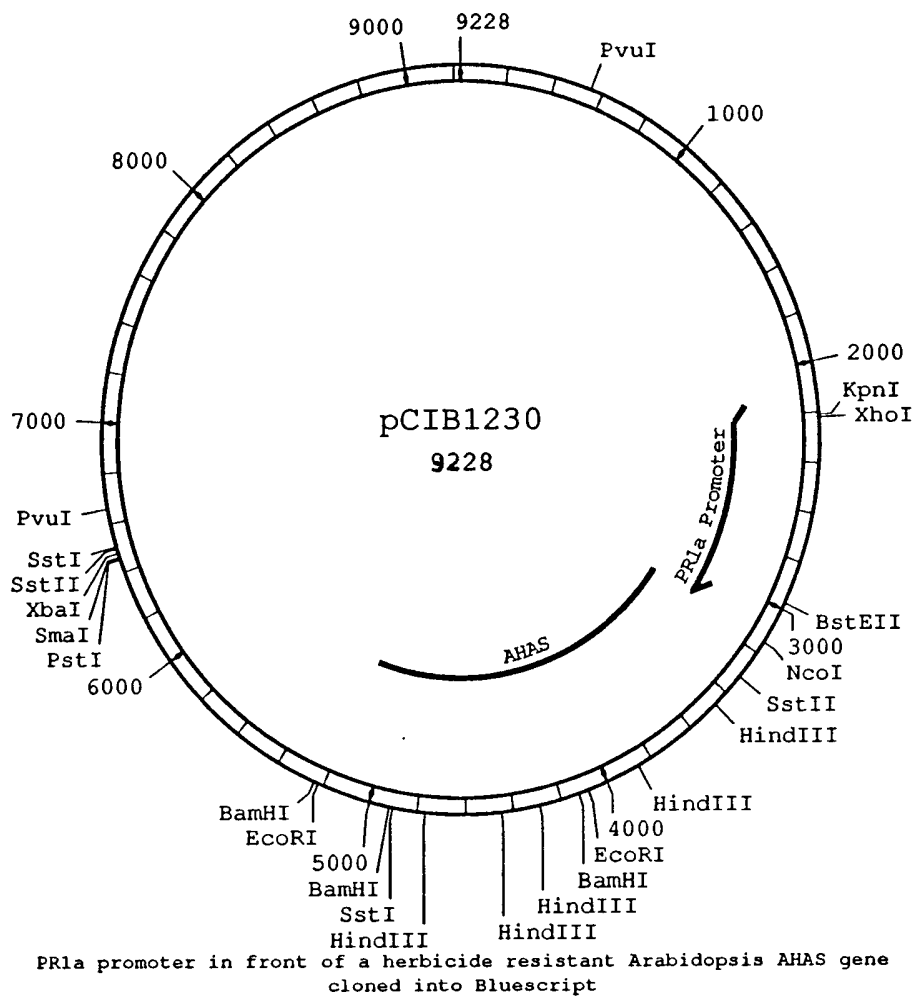
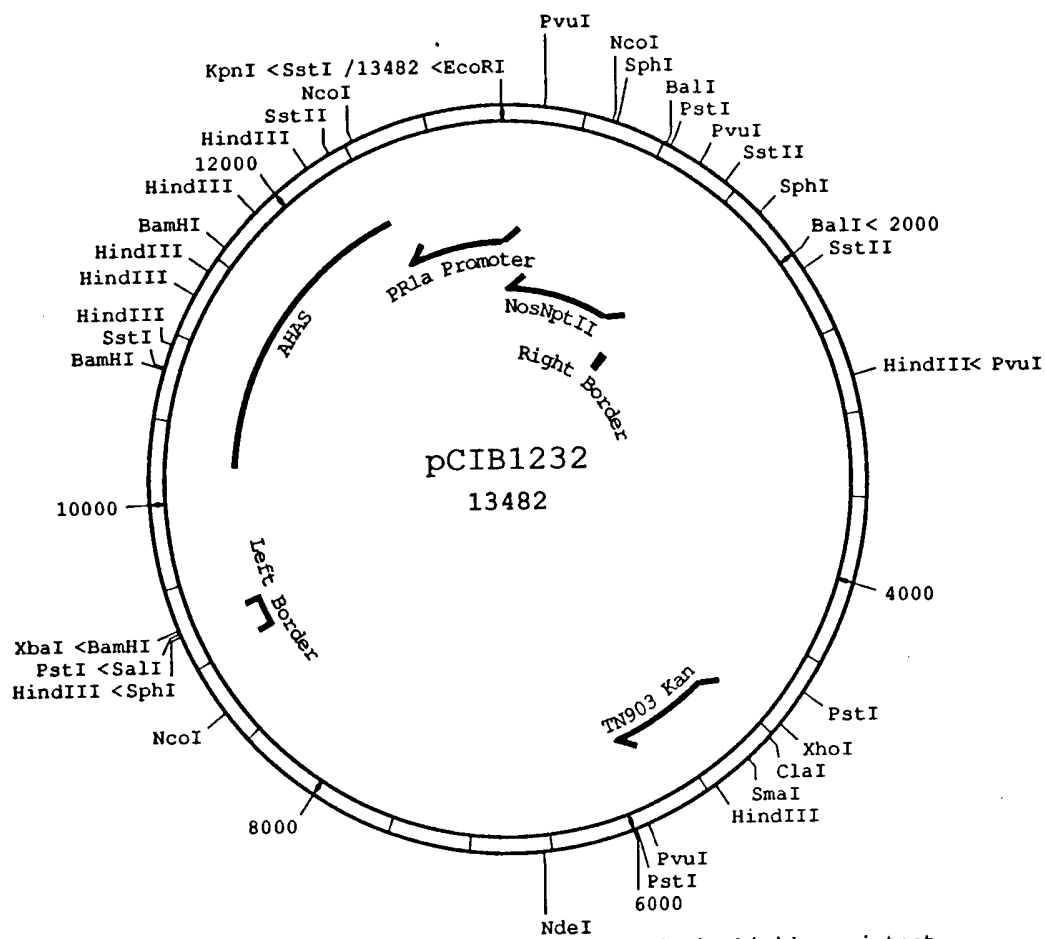


FIGURE 33



NdeI

Promoter sequence from PR1a gene in front of the herbicide resistant
Arabidopsis AHAS gene cloned into pCIB200.

FIGURE 34

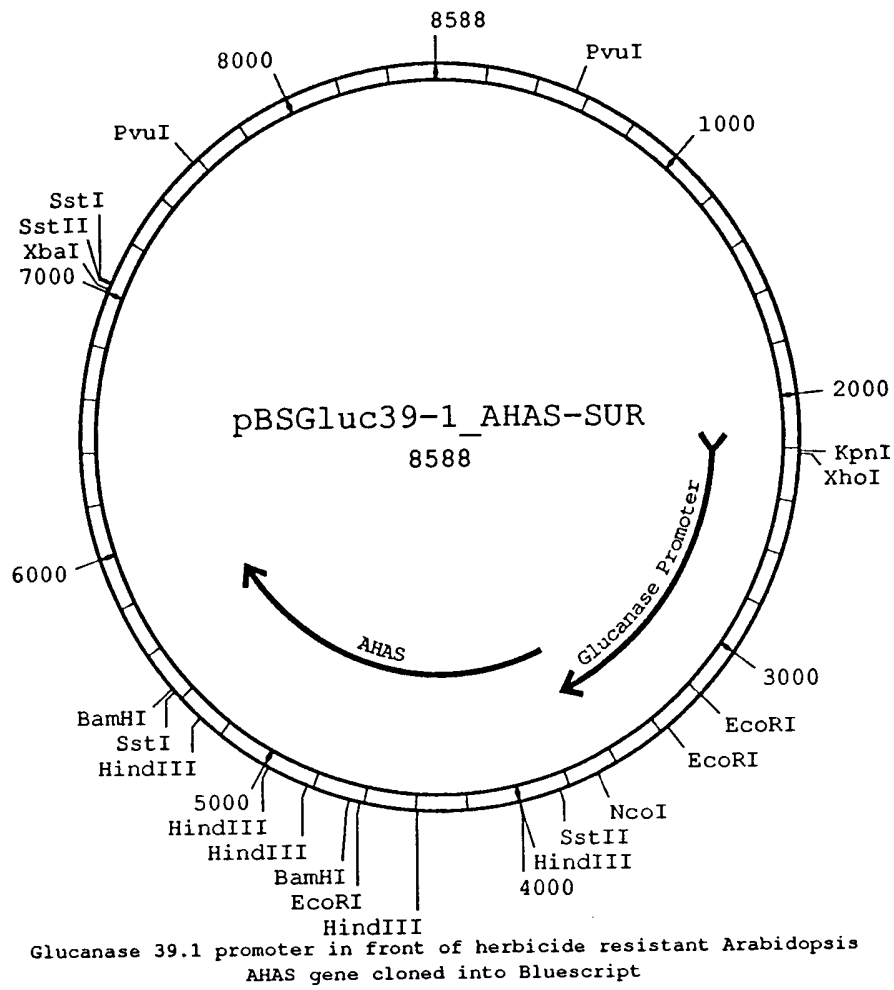


FIGURE 35

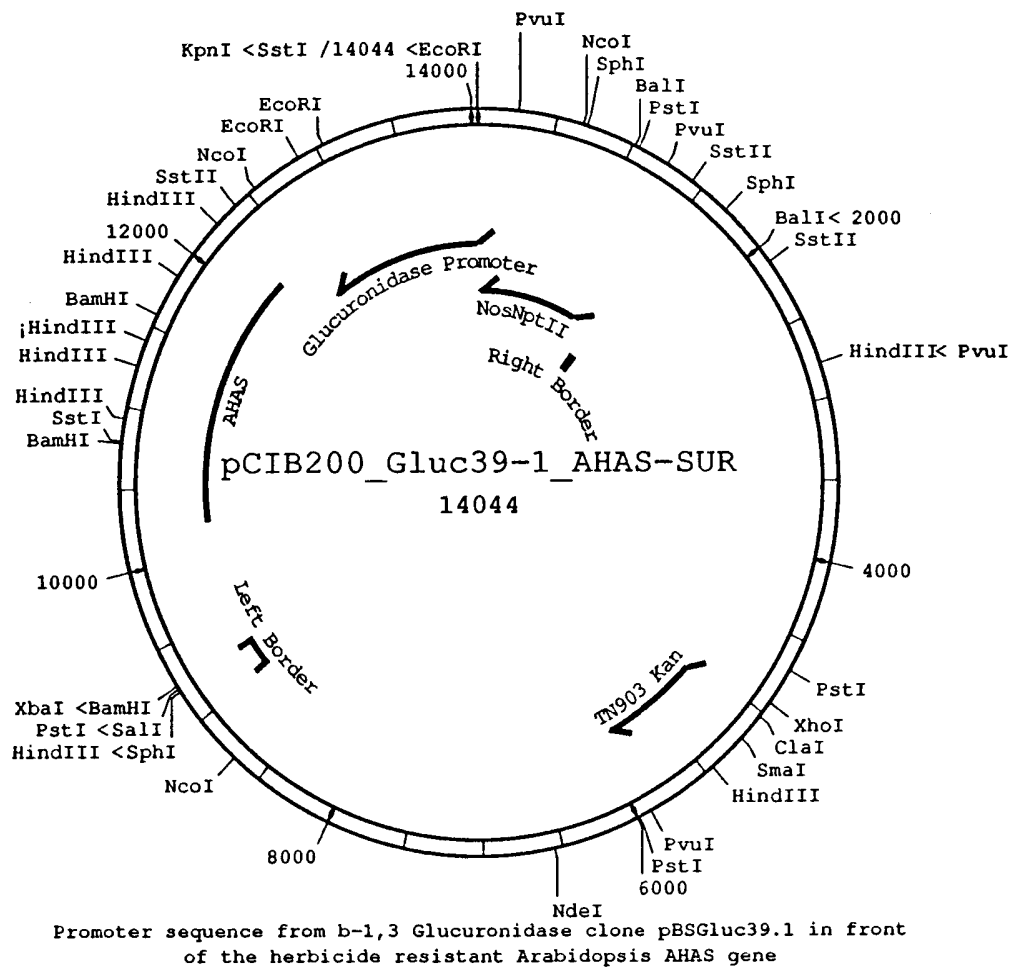


FIGURE 36

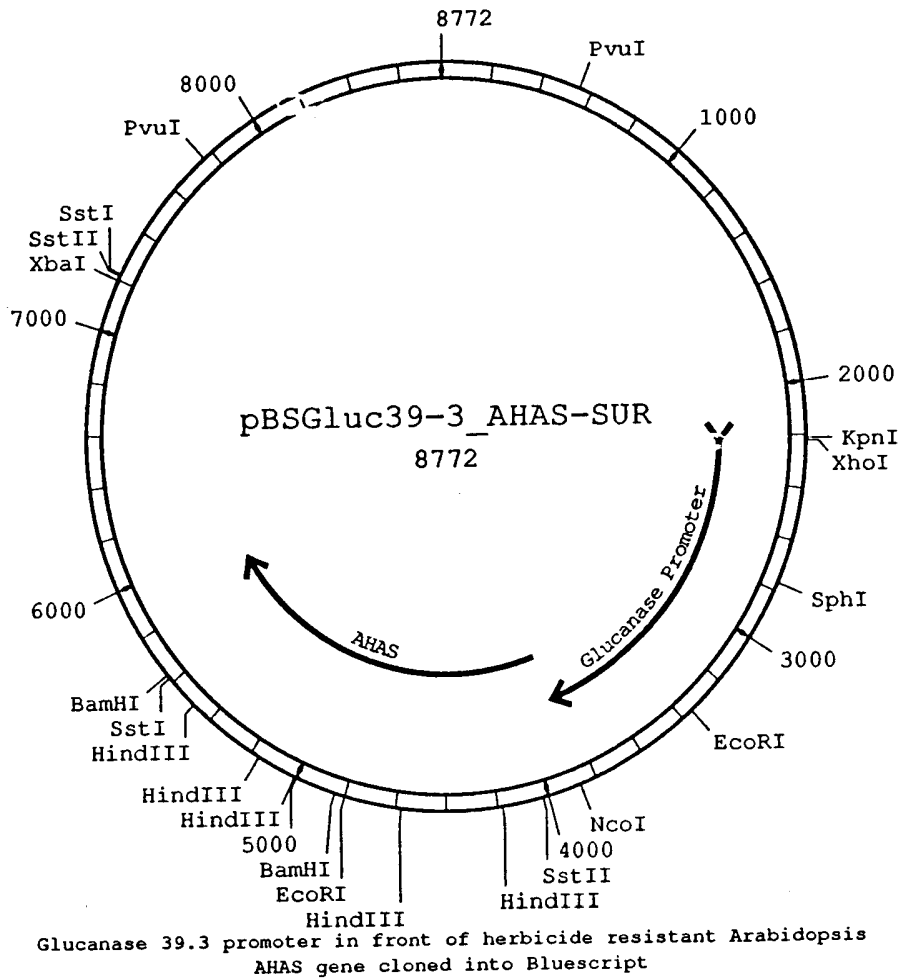


FIGURE 37

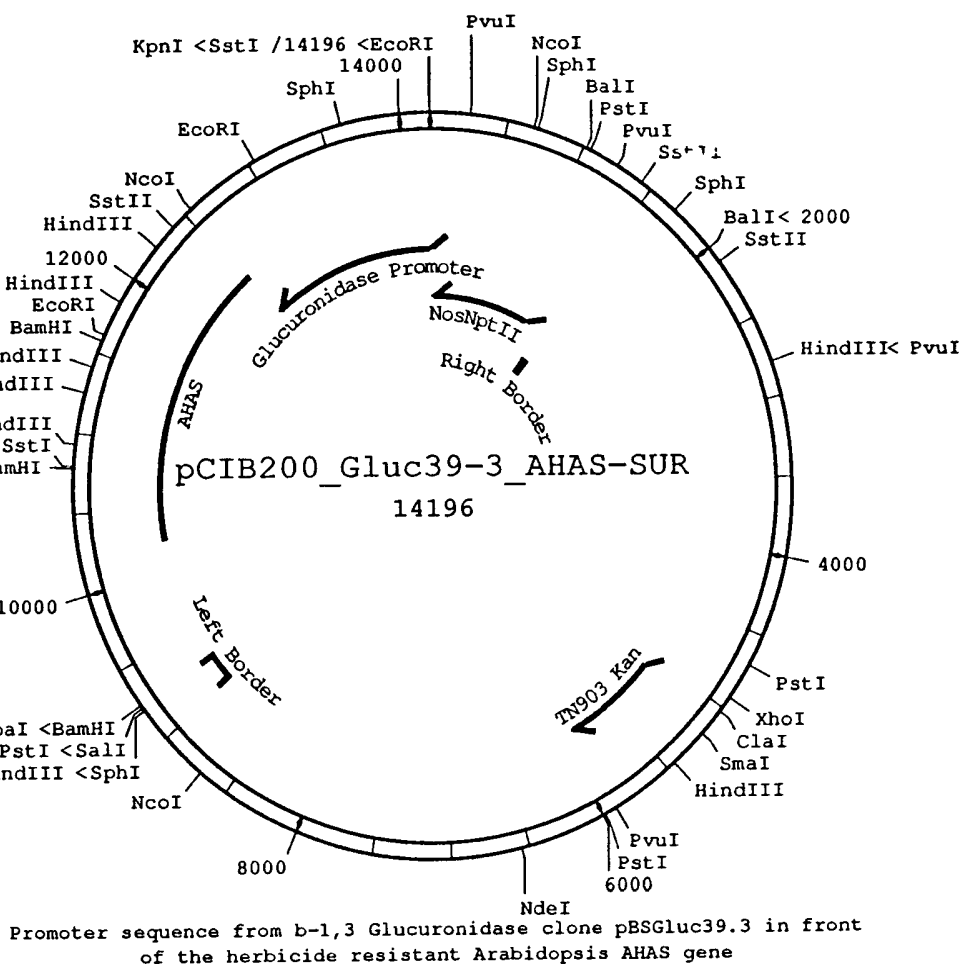


FIGURE 38