

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

292 953

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSL OVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1994 - 769

(22) Přihlášeno: 05.10.1992

(30) Právo přednosti:

04.10.1991 US 1991/772027

25.09.1992 US 1992/951715

(40) Zveřejněno: 15.03.1995

(Věstník č. 3/1995)

(47) Uděleno: 12.11.2003

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 14.01.2004

(Věstník č. 1/2004)

(86) PCT číslo: PCT/US92/08476

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 93/007278

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 N 15/32

C 12 N 15/82

C 12 N 15/54

C 12 N 15/10

C 12 N 15/60

C 07 K 14/325

A 01 H 5/00

A 01 N 63/02

(73) Majitel patentu:

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG, Basel, CH;

(72) Původce vynálezu:

Koziel Michael G., Cary, NC, US;

Desai Nalini M., Cary, NC, US;

Lewis Kelly S., Hillsborough, NC, US;

Kramer Vance C., Hillsborough, NC, US;

Warren Gregory W., Cary, NC, US;

Evola Stephen V., Apex, NC, US;

Crossland Lyle C., Chapel Hill, NC, US;

Wright Martha S., Cary, NC, US;

Merlin Ellis J., Raleigh, NC, US;

Launis Karen L., Franklinton, NC, US;

Rothstein Steven J., Guelph, NC, US;

(74) Zástupce:

Kubát Jan ing., pat. zástupce Advokátní a patentová
kancelář, U průhonu 36, Praha 7, 17000;

(54) Název vynálezu:

**Syntetická sekvence DNA s rozšířenou
insekticidní aktivitou v kukuřici**

(57) Anotace:

Popisuje se nukleotidová sekvence obsahující kódující sekvenci, která kóduje protein z *Bacillus thuringiensis* schopný usmrtit hmyz, přičemž tato kódující sekvence vykazuje alespoň 90% homologii s kódující sekvencí obsahující 100 % kukuřičí preferovaných kodonových sekvencí pro tento protein. Dále se popisují rekombinantní vektory a rostliny obsahující tyto nukleotidové sekvence a způsob jejich vytvoření. Rostliny kukuřice takto transformované vykazují vysokou úroveň exprese daného proteinu schopného usmrtit hmyz.

CZ 292953 B6

Syntetická sekvence DNA s rozšířenou insekticidní aktivitou v kukuřici

Oblast techniky

5

Vynález se týká sekvencí DNA, které kódují insekticidní proteiny, a exprese těchto sekvencí v rostlinách.

10 Dosavadní stav techniky

Exprese genů insekticidních proteinů (IP) získaných z *Bacillus thuringiensis* (Bt) v rostlinách se ukázala jako velmi obtížná. Byly prováděny pokusy exprimovat v rostlinách chimérické kombinace promotor / gen insekticidního proteinu Bt. Typicky však byla v transgenických
15 rostlinách získána pouze nízká hladina proteinu, viz například Vacek a kol., *Nature* 328: 33 – 37, 1987, Barton a kol., *Plant Physiol.* 85: 1103 – 1109, 1987, Fischhoff a kol., *Bio/Technology* 5: 807 – 813, 1987.

Jedním z předpokládaných vysvětlení příčin nízké exprese je názor, že náhodná místa
20 transkripčních úprav (processingu) vytváří aberantní formy mRNA–transkriptu insekticidního proteinu Bt. Tyto nenormálně upravené transkripty jsou v rostlinách z hlediska produkce insekticidního proteinu nefunkční. Mezi možná místa úprav patří místa polyadenylace, místa sestřihu intronů, signály terminace transkripce a signály pro transport. Většina genů neobsahuje
25 místa mající škodlivý vliv na expresi genu v normálním hostitelském organismu genu. Náhodný výskyt takových míst úprav v kódující oblasti však může komplikovat expresi tohoto genu v transgenických hostitelích. Například kódující oblast genu insekticidního krystalického proteinu Bt získaného z *Bacillus thuringiensis* kmen *kurstaki* (GENBANK BTHKURHD, přírůstkové číslo M15271, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, HD–1; Geiser a kol. *Gene* 48: 109 – 118 (1986)) může v důsledku přímého získání z *Bacillus thuringiensis* obsahovat místa, která
30 zabraňují náležité úpravě genu v rostlinách.

Při snaze o dosažení exprese proteinu z *Bacillus thuringiensis* v organismu jako je rostlina dochází i k dalším obtížím. Bylo zjištěno, že se použití kodonů v nativním genu insekticidního proteinu Bt podstatně liší od typického použití kodonů v rostlinném genu. Použití kodonů
35 v nativním genu insekticidního proteinu Bt se zejména podstatně liší od použití kodonů v genu kukuřice. V důsledku toho nemusí být mRNA z tohoto genu efektivně využita. Použití kodonů může ovlivnit expresi na úrovni translace, transkripce nebo úprav mRNA. Za účelem optimalizace insekticidního genu pro expresi v rostlinách byly prováděny pokusy změnit gen tak, aby se podobal v nejvyšší možné míře genům přirozeně obsaženým v transformované hostitelské
40 rostlině.

Adang a kol., v EP 0359472 (1990) popisují syntetický gen *Bacillus thuringiensis tenebrionis* (Btt), který je z 85 % homologický s nativním genem Btt a který je vytvořen tak, že se v něm
45 obsah A + T blíží tomuto obsahu zjištěnému obecně v rostlinách. Adang a kol. uvádějí v tabulce 1 sekvenci kodonů syntetického genu Btt vytvořenou tak, že se více podobá normální distribuci kodonů v genech dvouděložných rostlin. Adang a kol. uvádějí, že podobným způsobem může být optimalizován syntetický gen kódující insekticidní protein pro zlepšení exprese v jednoděložných rostlinách, a v tabulce 1 je znázorněna frekvence použití kodonů u vysoce
50 exprimovaných proteinů jednoděložných rostlin. Na straně 9 Adang a kol. uvádějí, že je syntetický gen Btt vytvořen tak, aby v něm obsah A + T činil 55 % (a obsah G + C tedy činí 45 %). Na straně 20 Adang a kol. popisují, že je syntetický gen vytvořen pomocí změny kodonů jednotlivých aminokyselin v nativním genu Bt tak, aby se v kódující oblasti tohoto genu odrážela celková distribuce kodonů preferovaných geny dvouděložných rostlin pro každou aminokyselinu. Adang a kol. dále uvádějí, že se pouze některé z kodonů nativního genu Btt zamění za kodony

nejvíce preferované rostlinami pro každou aminokyselinu, takže je zachována celková distribuce kodonů používaných u proteinů dvouděložných rostlin.

- 5 Fischhoff a kol. v EP 0 385 962 (1990) popisují rostlinné geny kódující krystalický proteinový toxin z *Bacillus thuringiensis*. V tabulce V Fischhoff a kol. uvádějí procentuální použití kodonů pro každou aminokyselinu. Na straně 8 navrhuje Fischhoff a kol. modifikaci nativního genu Bt odstraněním předpokládaných polyadenylačních signálů a sekvencí ATTTA. Fischhoff a kol. dále doporučují kvůli identifikaci předpokládaných polyadenylačních signálů rostlin vyhledat v sekvenci nativního genu Bt oblasti obsahující více než čtyři po sobě jdoucí nukleotidy adenin nebo thymin. Fischhoff a kol. uvádějí, že nukleotidová sekvence by měla být změněna pokud je mezi deseti nukleotidy navzájem identifikován více než jeden předpokládaný polyadenylační signál. Na straně 9 Fischhoff a kol. uvádějí, že by kodony měly být vybírány tak, aby byl obsah G + C upraven s výhodou přibližně na 50 %.
- 15 Perlak a kol., PNAS USA, 88: 3324 – 3328 (1991) popisují modifikované kódující sekvence genu cryIA(b) *Bacillus thuringiensis*, podobné jako uvádějí Fischhoff a kol. Perlak a kol. znázorňují v tabulce 1 na straně 3325, že jejich částečně modifikovaný gen cryIA(b) je přibližně z 96 % homologický s nativním genem cryIA(b) (1681 z 1743 nukleotidů), s obsahem G + C 41 %, při snížení počtu polyadenylačních signálních sekvencí rostlin z 18 na 7 a snížení počtu sekvencí ATTTA z 13 na 7. Perlak a kol. označují plně modifikovaný gen cryIA(b) jako plně syntetický (viz strana 3325, sloupec 1). Tento gen je přibližně ze 79 % homologický s nativním genem cryIA(b) (1455 z 1845 nukleotidů), s obsahem G + C 49 %, při snížení počtu polyadenylačních signálních sekvencí rostlin na 1 a odstranění všech sekvencí ATTTA.
- 20 Barton a kol. v EP 0431 829 (1991) popisují expresi insekticidních toxinů v rostlinách. Ve sloupci 10 popisují Barton a kol. konstrukci syntetického genu hmyzího toxinu AaIT kódujícího toxin šířící za použití nejvíce preferovaného kodonu pro každou aminokyselinu v souladu s diagramem znázorněným na obrázku 1 dokumentu.

30

Podstata vynálezu

Vynález se týká způsobů zvýšení exprese heterologních genů v rostlinných buňkách. Obecně se zajímavý gen nebo kódující oblast konstruuje tak, aby obsahovala sekvenci rostlinou specificky preferovaných kodonů. Tímto způsobem se změní použití kodonů pro konkrétní protein, aby se zvýšila exprese v konkrétní rostlině. Takovéto kódující sekvence optimalizované pro rostliny mohou být operabilně spojeny s promotory schopnými řídit expresi kódující sekvence v rostlinné buňce.

40 Konkrétně, jedním z předmětů vynálezu jsou syntetické geny insekticidních proteinů, které byly optimalizovány pro expresi v rostlinách.

45 Dalším předmětem vynálezu jsou syntetické geny insekticidních proteinů Bt pro maximalizaci exprese proteinů Bt v rostlině, výhodně v rostlině kukuřice. Podle jednoho provedení vynálezu se konstruuje syntetický gen insekticidního proteinu Bt za použití kodonů nejvíce preferovaných kukuřicí, kromě změn nutných pro zajištění míst ligace pro konstrukci plně syntetického genu.

50 V souladu s výše uvedenými předměty vynálezu jsme syntetizovali geny insekticidních krystalických proteinů Bt, ve kterých bylo změněno použití kodonů tak, aby se zvýšila exprese v rostlinách, zejména v kukuřici. Místo změny použití kodonů tak, aby se podobalo kukuřičnému genu ohledně celkové distribuce kodonů jsme však při syntéze syntetického genu spíše optimalizovali použití kodonů pomocí kodonů, které jsou v kukuřici nejvíce preferované (kukuřicí preferovaných kodonů). Optimalizované kukuřicí preferované použití kodonů umožňuje expresi insekticidního proteinu Bt ve vysokém množství, což může být důsledek maximalizace množství insekticidního proteinu Bt vzniklého translací z dané populace mediátorových RNA. Syntéza

genu insekticidního proteinu Bt za použití kukuřičí preferovaných kodonů má též za cíl odstranění náhodných míst úprav, která se mohou vyskytovat v nativní kódující sekvenci. Expres tohoto syntetického genu je v buňkách kukuřice podstatně vyšší než exprese nativního genu insekticidního proteinu Bt.

5

Výhodné syntetické, pro kukuřičí optimalizované sekvence DNA podle vynálezu jsou odvozeny od proteinu kódovaného genem cryIA(b) z *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki, HD-1; Geiser a kol., *Gene*, 48: 109 – 118 (1986) nebo genem cryIB (gen AKA Crya4), který popsali Brizzard a Whiteley, *Nuc. Acids, Res.*, 16: 2723 (1988). Sekvence DNA nativního genu kurstaki HD-1 cryIA(b) je znázorněna jako sekvence 1. Tyto proteiny jsou účinné proti mnoha druhům hmyzu z řádu motýlů, včetně zavíječe kukuřičního *Ostrinia nubilalis*.

10

Ačkoliv je ve vynálezu jako příklad uvedena syntéza genů proteinů Bt optimalizovaných pro kukuřičí, je zřejmé, že tento postup může být využit pro optimalizaci exprese libovolného proteinu v rostlinách.

15

Připravené optimalizované geny mohou být pro přípravu rekombinantních molekul DNA, tj. chimérických genů, spojeny s řadou promotorů, včetně konstitutivních, indukovatelných, časově regulovaných, vývojově regulovaných, tkáňově preferovaných a tkáňově specifických promotorů. Gen (kódující sekvence) optimalizovaný pro kukuřičí zajišťuje v porovnání s genem neoptimalizovaným pro kukuřičí v transformované rostlině podstatně vyšší úroveň exprese. V souladu s tím mohou být vytvořeny rostliny rezistentní vůči škůdcům z řádu brouků nebo motýlů, jako je *Ostrinia nubilalis* a *Diatraea saccharalis*.

20

Nukleotidové sekvence podle vynálezu mohou obsahovat tkáňově preferované a tkáňově specifické promotory, které řídí expresi operativně připojené optimalizované kódující sekvence v specifické části nebo částech rostliny za podstatného vyloučení exprese v ostatních částech.

25

Takovými promotory mohou být dřevňové preferované promotory. Termín „dřevňové preferovaný“ označuje, že promotor je schopen řídit expresi operativně připojeného strukturního genu v dřeni rostlin ve větším množství než v kořenech, vnějších obalech a opěrných kořenech, při v podstatě nulové expresi v semenech.

30

Výhodně lze použít též pylově specifické promotory. Termín „pylově specifický“ označuje, že promotor je schopen řídit expresi operativně připojeného zajímavého strukturního genu v podstatě výhradně v pylu rostliny, při zanedbatelné expresi v jakékoli další části rostliny. Termín „zanedbatelný“ znamená funkčně nevýznamný.

35

Dalším předmětem vynálezu jsou nukleotidové sekvence obsahující tkáňově preferovaný promotor nebo tkáňově specifický promotor operabilně spojený nebo navázaný k optimalizované kódující sekvenci kódující insekticidní protein z *Bacillus thuringiensis*, přičemž tyto sekvence lze exprimovat v rostlině.

40

Získají se tak transgenické rostliny, které exprimují alespoň jednu optimalizovanou kódující sekvenci, kódující insekticidní protein, operativně začleněnou v tkáňově preferovaném nebo tkáňově specifickém typu exprese.

45

V jednom z popsaných a v nárocích uvedených specifických provedení vynálezu je tkáňově preferovaný nebo tkáňově specifický promotor operabilně spojen se strukturním genem kódujícím insekticidní protein, a alespoň jednou takovouto rekombinantní molekulou je stabilně transformována rostlina. Výsledná rostlina je rezistentní vůči konkrétnímu hmyzu, který se živí na těch částech rostliny, ve které je tento gen (nebo tyto geny) exprimován. Výhodně strukturní geny kódují insekticidní proteiny B.t. Ještě výhodnější jsou geny insekticidních proteinů B.t. optimalizované pro kukuřičí.

50

55

Přehled obrázků na výkresech

- Obrázek 1 představuje porovnání nativního genu Bt cryIA(b) o plné délce (označen **BTHKURHD**), syntetického genu Bt cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici o plné délce (označen **fsynbt.fin**) a zkráceného syntetického genu Bt cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici (označen **bssyn**). Z tohoto obrázku je vidět, že sekvence syntetického genu cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici o plné délce odpovídá sekvenci nativního genu cryIA(b) v případě zhruba 2354 z 3468 nukleotidů (přibližně 68% homologie).
- Obrázek 2 znázorňuje porovnání zkráceného nativního genu Bt cryIA(b) (označen **BTHKURHD**) a zkráceného syntetického genu Bt optimalizovaného pro kukuřici (označen **bssyn**). Z tohoto obrázku je vidět, že sekvence zkráceného syntetického genu cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici odpovídá sekvenci nativního genu cryIA(b) v případě zhruba 1278 z 1947 nukleotidů (přibližně 66% homologie).
- Obrázek 3 představuje porovnání sekvence genu Bt zcela optimalizovaného pro kukuřici (označen **syn1T.mze**) se zkráceným syntetickým genem Bt optimalizovaným pro kukuřici (označen **bssyn**) a syntetickým genem Bt optimalizovaným pro kukuřici o plné délce modifikovaným tak, aby obsahoval restriční místa pro usnadnění konstrukce genu (označen **synful.mod**). Z tohoto obrázku je vidět, že sekvence zkráceného syntetického genu cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici odpovídá sekvenci genu cryIA(b) zcela optimalizovaného pro kukuřici v případě 1913 z 1947 nukleotidů (přibližně 98% homologie).
- Obrázek 4 znázorňuje porovnání nativního zkráceného genu Bt cryIA(b) (označen **BTHKURHD**) se zkráceným syntetickým genem cryIA(b), který popsali Perlak a kol., PNAS USA, 88: 3324 – 3328 (1991) (označen **PMONBT**) a zkráceným syntetickým genem Bt optimalizovaným pro kukuřici (označen **bssyn**). Z tohoto obrázku je vidět, že sekvence genu PMONBT odpovídá sekvenci nativního genu cryIA(b) v případě zhruba 1453 z 1845 nukleotidů (přibližně 79% homologie), zatímco zkrácený syntetický gen Bt cryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici odpovídá nativnímu genu cryIA(b) v případě zhruba 1209 z 1845 nukleotidů (přibližně 66% homologie).
- Obrázek 5 představuje porovnání zkráceného syntetického genu cryIA(b), který popsali Perlak a kol., PNAS USA, 88: 3324 – 3328 (1991) (označen **PMONBT**) a zkráceného syntetického genu Bt cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici (označen **bssyn**). Z tohoto obrázku je vidět, že sekvence genu PMONBT odpovídá sekvenci zkráceného syntetického genu Bt cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici v případě zhruba 1410 z 1845 nukleotidů (přibližně 77% homologie).
- Obrázek 6 znázorňuje gen CryIB optimalizovaný pro kukuřici o plné délce.
- Obrázek 7 představuje sekvenci DNA hybridního chimérického genu CryIA(b) částečně optimalizovaného pro kukuřici o plné délce, obsaženého v pCIB4434. Syntetickou oblast tvoří nukleotidy 1 – 1938 (aminokyseliny 1 – 646) a nativní oblast tvoří nukleotidy 1939 – 3468 (aminokyseliny 647 – 1155). Místo fúze mezi syntetickou a nativní kódující sekvencí je v sekvenci označeno lomítkem (/).
- Obrázek 8 znázorňuje mapu pCIB4434. Symbol **Btk-syn** označuje syntetickou část, symbol **Btk-n** označuje nativní část.
- Obrázek 9 představuje hybridní sekvenci DNA optimalizovanou pro kukuřici o plné délce, která kóduje tepelně stabilní protein CryIA(b) obsažený v pCIB5511.
- Obrázek 10 znázorňuje mapu pCIB5511.

Obrázek 11 představuje hybridní sekvenci DNA optimalizovanou pro kukuřici o plné délce, která kóduje tepelně stabilní protein CryIA(b) obsažený v pCIB5512.

5 Obrázek 12 znázorňuje mapu pCIB5512.

Obrázek 13 představuje sekvenci DNA optimalizovanou pro kukuřici o plné délce, která kóduje tepelně stabilní protein CryIA(b) obsažený v pCIB5513.

10 Obrázek 14 znázorňuje mapu pCIB5513. Symbol **GFCRYIA(b)syn** znamená syntetický GFCRYIA (b).

Obrázek 15 představuje sekvenci DNA optimalizovanou pro kukuřici o plné délce, která kóduje tepelně stabilní gen CryIA(b) obsažený v pCIB5514.

15 Obrázek 16 znázorňuje mapu pCIB5514.

Obrázek 17 představuje mapu pCIB4418.

20 Obrázek 18 znázorňuje mapu pCIB4420. Symbol **f** označuje PCR–fragment nahrazující místo Nco I dřevového promotoru (ATG je iniciační kodon) místem Bam HI, sekvence je dřevový promotor–5'–GGATCCAACA(ATG)–3'–syntetický Bt. Symbol **P** označuje dřevový promotor, symbol **syn–Bt** označuje syntetický Bt CryIA(b).

25 Obrázek 19 představuje mapu pCIB4429. Symbol **P** označuje pylový promotor.

Obrázek 20 znázorňuje mapu pCIB4431. Symbol **P** označuje pylový promotor.

Obrázek 21 představuje mapu pCIB4428. Symbol **P** označuje pylový promotor.

30 Obrázek 22 znázorňuje mapu pCIB4430. Symbol **P** označuje pylový promotor.

Na obrázku 23A je tabulka obsahující údaje o množství proteinu cryIA(b) v transgenické kukuřici. Množství Bt bylo stanoveno pomocí ELISA–testu u polních rostlin. Množství Bt je uvedeno
35 v ng cryIA(b) na mg celkového proteinu. Údaje byly získány u potomstva popsanych transformovaných rostlin kukuřice exprimujících protein cryIA(b). ELISA–test transgenického rostlinného materiálu byl prováděn za použití standardních postupů uvedených na libovolném místě. Symbol **I x P** označuje křížení inbrední linie x rodič, symbol **ABRU č.** označuje číslo rostliny a symbol **m** označuje množství Bt v ng na mg celkového proteinu.

40 Na obrázku 23 B je uvedena tabulka, která shrnuje výsledky biologických testů *Ostrinia nubilalis* a *Diatraea saccharalis* na listovém materiálu z potomstva kukuřice obsahující gen CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici.

45 Obrázek 23C představuje tabulku, která obsahuje údaje o množství proteinu cryIA(b) v transgenické kukuřici. Jedná se o rostliny pěstované ve skleníku. Množství Bt je uvedeno v ng cryIA(b) na mg celkového proteinu. Údaje byly získány u potomstva uvedených transformovaných rostlin kukuřice exprimujících protein cryIA(b). ELISA–test transgenického rostlinného materiálu byl prováděn za použití standardních postupů uvedených na libovolném místě. Symbol
50 **NT** znamená netestováno.

Na obrázku 23D je uvedena tabulka, která shrnuje výsledky biologických testů *Ostrinia nubilalis* na listovém materiálu z potomstva kukuřice obsahující syntetický gen Bt pro kukuřici operabilně spojený s dřevovým promotorem.

55

Na obrázku 23E je uvedena tabulka, která obsahuje údaje o expresi genu cryIA(b) v transgenické kukuřici za použití dřevňové preferovaného promotoru. U listových vzorků malých klíčnic rostlin transformovaných za použití postupů popsaných na libovolném místě pCIB4433 byla analyzována přítomnost proteinu cryIA(b) pomocí ELISA-testu. Všechny rostliny exprimující cryIA(b) byly v standardním biologickém testu s *Ostrinia nubilalis* označeny za insekticidní. Je třeba vzít v úvahu, že dřevňové preferovaný promotor vykazuje nízkou, avšak detekovatelnou úroveň exprese v listové tkáni kukuřice. Detekce proteinu CryIA(b) je v souladu s tímto typem exprese. Symbol č znamená rostlina číslo, symbol M znamená množství cryIA(b) v ng na mg celkového proteinu.

Obrázek 24 představuje úplnou sekvenci genomové DNA genu alfa podjednotky tryptofan-synthasy (genu podjednotky TrpA) kukuřice. Znázorněny jsou introny, exony, místa počátku transkripce a translace a počátek a konec cDNA. Symbol \$ označuje počátek a konec cDNA, +1 je počátek transkripce, 73***** označuje primer pro metodu zkoumající prodloužení primeru „primer extension“, symbol □ označuje počátek translace, +++ označuje terminační kodon, v poloze bp 1495 – 1499 je podtržen CCAAT box, v poloze bp 1593 – 1598 je podtržen TATAA box a v poloze bp 3720 – 3725 polyadenylační signál; čísla nad ostatními podtrženými sekvencemi označují primery pro polymerázovou řetězovou reakci.

Obrázky 25A, 25B, 25C a 25D představují výsledky analýzy pomocí Northern blottingu, které ukazují diferencovanou expresi kukuřičného genu podjednotky TrpA v tkáni kukuřice po expozici 2 hodiny (obr. 25A), 4 hodiny (obr. 25B), 18 hodin (obr. 25C), respektive 48 hodin (obr. 25D), při –80 °C při zesilování obrazu pomocí DuPont Cronex intensifying screens. Jednotlivé obecné symboly mají následující význam: P = dřevň, C = palice, BR = opěrné kořeny, ES = větveno, LP = dřevň spodní části, MP = dřevň střední části, UP = dřevň vrchní části, S = semeno, L = list, R = kořen a P (nahore vlevo) = dřevň celkem.

Obrázek 26 představuje výsledek analýzy pomocí Northern blottingu, na kterém dvě levé dráhy znázorňují expresi kukuřičného genu podjednotky TrpA v listech (označeno L) a dřevni (označeno P) inbredních linií Funk 211D a 5N984. Pět pravých drah svědčí o nepřítomnosti exprese v celkové RNA semen Funk 211D. Symbol S(1, 2, 3, 4 a 5) znamená semena 1, 2, 3, 4 a 5 týdnů po opylení. Film byl exponován po dobu 65 hodin při –80 °C při zesilování obrazu pomocí DuPont Cronex intensifying screens.

Obrázek 27 znázorňuje výsledek pomocí Southern blottingu prováděné analýzy genomové DNA linie Funk 211D, kdy jako sondy bylo použito cDNA 8–2 kukuřičné TrpA (pCIB5600).

Symbol B znamená BamHI, symbol E EcoRI, symbol EV EcoRV, symbol H HindIII a symbol S SacI. Symboly 1X, 5X a 10X označují ekvivalenty kopií rekonstruovaného genu. Film byl exponován po dobu 120 hodin při –80 °C při zesilování obrazu pomocí DuPont Cronex intensifying screens.

Obrázek 28A představuje výsledky analýzy pomocí „primer extension“, a znázorňuje počátek transkripce kukuřičného genu podjednotky TrpA a jednotlivé dráhy po sekvenování („sekvenační žebřík“). Dráhy 1 a 2 představují 1X a 0,5X vzorky po reakci „primer extension“. Film byl exponován po dobu 1 hodiny při –80 °C při zesilování obrazu pomocí DuPont Cronex intensifying screens.

Obrázek 28B znázorňuje analýzu oblasti od +2 bp do +387 bp za použití metody chránění proti účinkům RNasy („RNase protection“) při teplotách teplotní hybridizace 42 °C, 48 °C a 54 °C. Film byl exponován po dobu 16 hodin při –80 °C při zesilování obrazu pomocí DuPont Cronex intensifying screens.

Obrázek 29 představuje mapu původního pylově specifického cDNA-klonu typ II. Je zde znázorněno subklonování tří EcoRI-fragmentů do vektorů pBluescript, kterým se vytvoří pCIB3168, pCIB3169 a II-6.

- 5 Obrázek 30 znázorňuje sekvenci DNA cDNA kukuřičného genu pylově specifické kalcium-dependentní protein-kinázy, jak je obsažena ve fragmentech původního cDNA-klonu typ II o velikosti 1,0 kb a 0,5 kb (v kloněch pCIB3168 a pCIB3169). Je označeno místo EcoRI, které rozděluje fragmenty o velikosti 1,0 kb a 0,5 kb. Tato cDNA nemá plnou délku, jelikož se počáteční místo mRNA nachází 490 bp upstream od konce cDNA-klonu.

- 10 Obrázek 31 ilustruje tkáňově specifickou expresi mRNA pylově specifické kalcium-dependentní protein-kinázy. U RNA z uvedených tkání kukuřice 211D byla provedena denaturace, elektroforéza na agarózovém gelu, přenos na nitrocelulózu, a jako sondy bylo použito cDNA-fragmentu pylově specifické kalcium-dependentní protein-kinázy o velikosti 0,5 kb.
- 15 mRNA je detekovatelná pouze v pylu, kde je vidět silný signál. Jednotlivé symboly mají tento význam: VLP = vnitřní část listové pochvy, VL = vnitřní část listového přeslenu, ZL = zelený list, A = prašník, P = pyl, V = vlákno, Z = zrno, D = dřev a K = kořen.

- Obrázek 32 představuje porovnání sekvence aminokyselin proteinové sekvence odvozené pro pylově specifickou kalcium-dependentní protein-kinázu (označeno **pol CDPK ptn**) a proteinové sekvence protein-kinázy 2 krysy, kterou popsali Tobimatsu a kol., J. Biol. Chem. 263: 16082 – 16086 (1988) (označeno **rat pk2 ptn**). Pro vyhodnocení sekvencí byl použit Align program ze softwarového souboru DNASTAR. Homologie s protein-kinázou je zjevná ve dvou třetinách od 5'-konce genu, tj. ve fragmentu o velikosti 1,0 kb. Jedná se o porovnání proteinů
- 25 Lipman-Pearson, významnost mezery (gap penalty) = 2, významnost délky mezery (gap length penalty) = 12. Sekvencí 1 je pol CDPK ptn (1>551), sekvencí 2 je rat pk2 ptn (1>528), index podobnosti činí 36,5, počet mezer 4, délka mezer 4, konsenzuální délka 297.

- Obrázek 33 představuje porovnání sekvence aminokyselin proteinové sekvence odvozené pro pylově specifickou kalcium-dependentní protein-kinázu (označeno **pol CDPK ptn**) a proteinové sekvence kalmodulinu člověka, kterou popsali Fischer a kol., J. Biol. Chem. 263: 17055 – 17062 (1988) (označeno **humcama ptn**). Homologie s kalmodulinem je zjevná v jedné třetině od 3'-konce genu, tj. ve fragmentu o velikosti 0,5 kb. Jedná se o porovnání proteinů
- 30 Lipman-Pearson, gap penalty = 2, gap length penalty = 12. Sekvencí 1 je pol CDPK ptn (1>551), sekvencí 2 je humcama ptn (1>150), index podobnosti činí 40,3, počet mezer 2, délka mezer 2, konsenzuální délka 142.

- Obrázek 34 představuje porovnání sekvence aminokyselin proteinové sekvence odvozené pro pylově specifickou kalcium-dependentní protein-kinázu (označeno **pol CDPK ptn**) a proteinové sekvence kalcium-dependentní protein-kinázy sóji (označeno **soybean CDPK ptn**). Homologie je zjevná v celém genu. Jedná se o porovnání proteinů Lipman-Pearson, gap penalty = 2, gap length penalty = 12. Sekvencí 1 je pol CDPK ptn (1>551), sekvencí 2 je soybean CDPK ptn (1>509), index podobnosti činí 62,4, počet mezer 1, délka mezer 1, konsenzuální délka 464.

- 45 Obrázek 35 znázorňuje sekvenci kukuřičného genu pylově specifické kalcium-dependentní protein-kinázy. Je znázorněno 1,4 kb sekvence před počátečním místem mRNA. Pod odpovídající sekvencí DNA jsou označeny polohy sedmi exonů a šesti intronů. Uvedeno je místo polyadenylace v cDNA-klonu. Symbol mRNA start označuje místo počátku mRNA. Uvedena je sekvence a místa mapy genu pylově specifické kalcium-dependentní protein-kinázy (1>4165)
- 50 (enzymy: 6 ze 198 enzymů (filtrováno), úprava: cirkulární, pouze některá místa, standardní genetický kód).

Obrázek 36 představuje mapu pCIB4433. Symbol P znamená dřevňový promotor.

Obrázek 37 znázorňuje hybridní sekvenci DNA optimalizovanou pro kukuřici o plné délce, kódující tepelně stabilní protein cryIA(b) (označení: pCIB5515, cirkulární DNA 7415 bp, popis: pGF1 + syntetický geiser fix).

5 Obrázek 38 představuje mapu pCIB5515.

Popis sekvencí

10 Sekvence 1 představuje sekvenci DNA nativního genu Bt cryIA(b) o plné délce.

Sekvence 2 znázorňuje sekvenci DNA syntetického genu Bt cryIA(b) zcela optimalizovaného pro kukuřici o plné délce.

15 Sekvence 3 představuje sekvenci DNA zkráceného syntetického genu Bt cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici o velikosti přibližně 2 kb.

Sekvence 4 znázorňuje sekvenci DNA syntetického genu Bt cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici o plné délce.

20 Sekvence 5 představuje sekvenci DNA syntetického genu Bt, který popsali Perlak a kol., o velikosti přibližně 2 kb.

Podrobný popis vynálezu

Z důvodů jasného vymezení termínů používaných v popisu a nárocích vynálezu jsou uvedeny následující definice.

30 Kukuřicí preferovaný kodon: Termín preferovaný kodon se týká preferencí vykazovaných specifickou hostitelskou buňkou při použití nukleotidových kodonů specifických danou aminokyselinu. Preferovaným kodonem pro aminokyselinu v případě konkrétního hostitele je jediný kodon, který v tomto hostiteli nejčastěji kóduje tuto aminokyselinu. Kukuřicí preferovaný kodon pro konkrétní aminokyselinu lze odvodit ze známých genových sekvencí z kukuřice.

35 Například použití kodonů u kukuřice u 28 genů z rostlin kukuřice uvedli Murray a kol. v tabulce 4 práce zveřejněné v Nucleic Acids Research, 17: 477 – 498 (1989). Například kukuřicí preferovaný kodon pro alanin je GCC, jelikož na základě spojení sekvencí 26 genů kukuřice, jak uvádějí Murray a kol., viz výše, tento kodon kóduje alanin v 36 % případů, ve srovnání s kodonem GCG (24 %), GCA (13 %) a GCT (27 %).

40 Sekvence zcela optimalizovaná pro kukuřici: Optimalizovaný gen nebo sekvence DNA označuje gen, ve kterém byla nukleotidová sekvence nativního genu modifikována tak, aby byly využívány kodony preferované kukuřicí. Například, syntetickým genem Bt cryIA(b) optimalizovaným pro kukuřici je gen, ve kterém byla nukleotidová sekvence nativního genu Bt cryIA(b) modifikována

45 tak, že používanými kodony jsou kukuřicí preferované kodony, jak je popsáno výše. Genem zcela optimalizovaným pro kukuřici je gen, ve kterém nukleotidová sekvence obsahuje 100 % kukuřicí preferovaných kodonových sekvencí pro konkrétní polypeptid. Například genem Bt cryIA(b) zcela optimalizovaným pro kukuřici je gen, ve kterém nukleotidová sekvence obsahuje 100 % kukuřicí preferovaných kodonových sekvencí a kóduje polypeptid se stejnou sekvencí

50 aminokyselin jako má polypeptid produkovaný nativním genem Bt cryIA(b). Nukleotidová sekvence optimalizovaného genu může být změněna tak, aby umožňovala manipulaci s genem, přičemž mezi tyto úpravy patří například změna nukleotidů kvůli vytvoření nebo odstranění restričních míst. Nukleotidová sekvence optimalizovaného genu může být též změněna tak, aby byla odstraněna potenciální škodlivá místa úprav, jako jsou potenciální místa polyadenylace nebo

55 místa rozpoznání intronů.

Je zřejmé, že mohou být využity též sekvence „částečně optimalizované pro kukuřici“. Termín částečně optimalizované pro kukuřici znamená, že kódující oblast genu je chimérická (hybridní), protože sestává ze sekvencí získaných z nativního insekticidního genu a sekvencí, které byly
 5 optimalizovány pro expresi v kukuřici. Částečně optimalizovaný gen exprimuje insekticidní protein v množství dostatečném pro kontrolu hmyzích škůdců, a tato exprese je na vyšší úrovni než exprese dosažená za použití pouze nativních sekvencí. Mezi sekvence částečně optimalizované pro kukuřici patří sekvence, které obsahují alespoň asi 5 % optimalizovaných sekvencí.

10 Termín „geny Bt o plné délce“ označuje sekvence DNA obsahující úplnou nukleotidovou sekvenci nutnou pro kódování polypeptidu produkovaného nativním genem Bt. Například nativní gen Bt cryIA(b) je dlouhý přibližně 3,5 kb a kóduje polypeptidu o délce přibližně 1150 aminokyselin. Syntetický gen Bt cryIA(b) o plné délce má délku alespoň přibližně 3,5 kb.

15 Termín „zkrácené geny Bt“ označuje sekvence DNA, které obsahují méně než úplnou nukleotidovou sekvenci nutnou pro kódování polypeptidu produkovaného nativním genem Bt, ale které kódují část polypeptidu aktivní jako toxin. Například zkrácený syntetický gen Bt o velikosti přibližně 1,9 kb kóduje takovou část polypeptidu aktivní jako toxin, že proteinový produkt vykazuje insekticidní aktivitu.

20 Termín „tkáňově preferovaný promotor“ znamená, že daná regulační sekvence DNA způsobuje vyšší úroveň transkripce připojeného strukturního genu nebo kódující sekvence DNA, nebo exprese produktu připojeného genu, jak se stanoví libovolným běžným RNA–testem nebo proteinovým testem, nebo že daná sekvence DNA vykazuje některé odlišné účinky, tj., že je transkripce připojených sekvencí DNA nebo exprese genového produktu vyšší v některé tkáni než ve všech ostatních tkáních rostliny.

30 Termín „tkáňově specifický promotor“ znamená, že daná regulační sekvence DNA způsobuje transkripci připojené kódující sekvence DNA v podstatě pouze v jedné nebo několika tkáních v rostlině, nebo v jednom typu tkáně, například zelené tkáni, zatímco ve všech ostatních tkáních nebo typech tkání rostliny nedochází v podstatě k žádné transkripci připojené kódující sekvence DNA.

35 Vynález popisuje sekvence DNA optimalizované pro expresi v rostlinách, zejména v rostlinách kukuřice. Podle výhodného provedení vynálezu kódují sekvence DNA jako produkt insekticidní toxin, výhodně polypeptid mající v podstatě sekvenci aminokyselin jako insekticidní krystalický proteinový toxin normálně produkovaný *Bacillus thuringiensis*. Syntetický gen může kódovat zkrácený insekticidní protein nebo insekticidní protein o plné délce. Zejména výhodné jsou
 40 syntetické sekvence DNA kódující polypeptid účinný proti hmyzu řádu Lepidoptera a Coleoptera, a syntetické sekvence DNA kódující polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci v podstatě stejnou jako jeden z krystalických proteinových toxinů *Bacillus thuringiensis* varieta kurstaki, HD-1.

45 Vynález popisuje syntetické sekvence DNA umožňující dosažení vysoké exprese aktivních insekticidních proteinů v rostlinách, zejména v protoplastech, rostlinných buňkách a rostlinách kukuřice. Syntetické sekvence DNA podle vynálezu byly modifikovány tak, aby se podobaly, pokud se týká použití kodonů a obsahu G + C, genům kukuřice. V důsledku těchto modifikací neobsahují syntetické sekvence DNA podle vynálezu potenciální místa úprav, která jsou
 50 přítomna v nativním genu. Výsledné syntetické sekvence DNA (syntetické kódující sekvence insekticidního proteinu Bt) a vektory pro transformaci rostlin obsahující tyto syntetické sekvence DNA (syntetické geny insekticidního proteinu Bt) mají za následek ve srovnání s nativním genem insekticidního proteinu Bt překvapivě zvýšenou expresi syntetického genu insekticidního proteinu Bt, pokud se týká produkce insekticidního proteinu v rostlinách, zejména kukuřici.

Vysoká úroveň exprese způsobuje, že buňky a rostliny kukuřice vykazují rezistenci vůči hmyzu z řádu motýlů, zejména vůči *Ostrinia nubilalis* a *Diatraea saccharalis*.

5 Syntetické sekvence DNA podle vynálezu jsou vytvořeny tak, že kódují insekticidní proteiny z *Bacillus thuringiensis*, ale jsou optimalizovány pro expresi v kukuřici, pokud se týká obsahu G + C a použití kodonů. Například tabulka použití kodonů u kukuřice, kterou popsali Murray a kol., viz výše, se použije k reverzní translaci sekvence aminokyseliny toxinu produkovaného genem *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 cryIA(b), za použití pouze kodonů nejvíce preferovaných kukuřicí. Sekvence DNA vzniklá reverzní translací se označuje jako sekvence
10 zcela optimalizovaná pro kukuřici a je znázorněna jako sekvence 4. Tato sekvence se následně modifikuje tak, aby se odstranila nežádoucí rozpoznávací místa pro restriční endonukleázy a vytvořila požadovaná rozpoznávací místa pro restriční endonukleázy. Tyto modifikace se provádí tak, aby se usnadnilo klonování genu, aniž by se výrazně měnilo použití kodonů nebo sekvence optimalizovaná pro kukuřici. Během postupu klonování se v oblastech, které se jeví
15 jako zejména citlivé k chybám vyvolaným během klonování pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), vytvoří další modifikace, kvůli usnadnění klonování genu. Výsledná sekvence syntetického genu insekticidního proteinu Bt optimalizovaného pro kukuřici je znázorněna jako sekvence 2. Porovnání syntetického genu insekticidního proteinu Bt optimalizovaného pro kukuřici s nativním genem Bt *kurstaki* cryIA(b) je uvedeno na obrázku 1.

20 Podle výhodného provedení vynálezu je protein produkovaný pomocí syntetické sekvence DNA účinný proti hmyzu z řádu *Lepidoptera* nebo *Coleoptera*. Podle ještě výhodnějšího provedení je tvořen polypeptid kódovaný syntetickou sekvencí DNA v podstatě zkrácenou sekvencí aminokyselin nebo sekvencí aminokyselin o plné délce insekticidního proteinu normálně produkovaného *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. Podle zejména výhodného provedení
25 kóduje syntetická sekvence DNA polypeptid sestávající v podstatě ze zkrácené sekvence aminokyselin proteinu Bt CryIA(b).

Insekticidní proteiny podle vynálezu jsou v rostlině exprimovány v množství dostatečném pro kontrolu hmyzích škůdců, tj. v množstvích kontrolujících hmyz. Je zřejmé, že se exprimované množství insekticidního proteinu v rostlině nutné pro kontrolu hmyzu může lišit v závislosti na druhu rostliny, typu hmyzu, faktorech prostředí a podobně. Obecně bude populace hmyzu udržována pod prahem ekonomické škodlivosti, který se liší v závislosti na rostlině. Například
30 pro kontrolu *Ostrinia nubilalis* u kukuřice činí práh ekonomické škodlivosti 0,5 vaječné hmoty na rostlinu, ze které vznikne přibližně 10 larev na rostlinu.

Způsoby podle vynálezu jsou vhodné pro kontrolu široké řady hmyzu, včetně, ale nikoliv výlučně, hmyzu vybraného ze skupiny zahrnující travičáky, osenice, různé druhy rodu *Spodoptera*, zejména *Spodoptera frugiperda* a *Spodoptera exigua*, drátovce (larvy kováříků),
40 mšice, zavíječe, zejména zavíječe kukuřičného *Ostrinia nubilalis*. *Diatraea saccharalis*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Zeadiatraca grandiosella*, atd.

Podle výhodného provedení vynálezu obsahuje syntetická kódující sekvence DNA optimalizovaná pro expresi v kukuřici vyšší procento G + C než nativní gen cryIA(b). Je výhodné, pokud činí
45 procento G + C alespoň asi 50 %, a ještě výhodnější pokud činí alespoň asi 60 %. Zejména je výhodné, pokud činí obsah G + C přibližně 64 %.

Podle dalšího výhodného provedení vynálezu obsahuje syntetická kódující sekvence DNA optimalizovaná pro expresi v kukuřici nukleotidovou sekvencí, která je alespoň z přibližně
50 90 % homologická s nukleotidovou sekvencí zcela optimalizovanou pro kukuřici nativního proteinu *Bacillus thuringiensis* cryIA(b), ještě výhodněji je alespoň z přibližně 95 % homologická a nejvýhodněji alespoň z přibližně 98 % homologická.

Mezi další výhodná provedení vynálezu patří syntetické sekvence DNA, které mají v podstatě
55 sekvenci DNA uvedenou v Sekvenci 4, stejně jako jejich mutanty nebo variace; transformační

vektory obsahující sekvenci DNA v podstatě jako je sekvence 4; a izolované sekvence DNA získané z plazmidů pCIB4406, pCIB4407, pCIB4413, pCIB4414, pCIB4416, pCIB4417, pCIB4418, pCIB4419, pCIB4420, pCIB4421, pCIB4421, pCIB4423, pCIB4434, pCIB4429, pCIB44312, pCIB4433. Nejvýhodnější jsou izolované sekvence DNA získané z plazmidů pCIB4418 a pCIB4420, pCIB4434, pCIB4429, pCIB4431, a pCIB4433.

Za účelem zkonstruování jedné ze sekvencí DNA optimalizovaných pro kukuřici podle vynálezu se vytvoří syntetické DNA–oligonukleotidy o průměrné délce přibližně 80 nukleotidů. Tyto nukleotidy se zkonstruují tak, aby hybridizovaly s fragmenty produktu obsahujícími různé čtvrtiny zkráceného genu toxinu. Oligonukleotidy pro danou čtvrtinu se nechají hybridizovat a amplifikují se za použití polymerázové řetězové reakce. Čtvrtiny se poté klonují a naklonované čtvrtiny se sekvenují, aby byly nalezeny ty, které obsahují požadované sekvence. V případě čtvrté čtvrtiny se hybridizované oligonukleotidy klonují přímo bez amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce. Jakmile jsou nalezeny všechny klony čtyř čtvrtin, které obsahují otevřené čtecí rámce, sestaví se intaktní gen kódující aktivní insekticidní protein. U sestaveného genu může být poté testována jeho insekticidní aktivita vůči libovolnému zajímavému hmyzu včetně *Ostrinia nubilalis* a *Diatraea saccharalis* (příklady 5A, respektive 5B). Pokud se získá úplně funkční gen, je znovu sekvenován, aby se potvrdila jeho primární struktura. Bylo zjištěno, že plně funkční gen způsobuje při biologickém testu s *Ostrinia nubilalis* 100% mortalitu. Plně funkční gen se též modifikuje pro expresi v kukuřici.

Gen optimalizovaný pro kukuřici se testuje pomocí testu dočasné exprese, například testu dočasné exprese v kukuřici. Nativní kódující sekvence Bt cryIA(b) pro aktivní insekticidní toxin není při použití systému dočasné exprese v kukuřici exprimována v detekovatelném množství. Může být tedy stanovena úroveň exprese syntetizovaného genu. Uvedenými způsoby může být exprese proteinu v transformované rostlině zvýšena alespoň zhruba stonásobně až přibližně 50 000–násobně, přesněji alespoň zhruba 1000–násobně až alespoň zhruba 20 000–násobně.

Pro zvýšení exprese insekticidního genu na účinnou úroveň není nutná manipulace s celou sekvencí nativního genu. Účinné exprese lze dosáhnout pomocí manipulace pouze s částí sekvencí nutnou pro dosažení zvýšené exprese. Lze připravit gen CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici o plné délce, který obsahuje protein nativní sekvence CryIA(b). Například na obrázku 7 je znázorněn gen CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici o plné délce, který je hybridem sestávajícím ze syntetické a nativní části. Část genu o velikosti přibližně 2 kb (nukleotidy 1 – 1938) je optimalizována pro kukuřici, tj. syntetická, a zbytek, tj. C–koncové nukleotidy 647 – 1155, je identický s odpovídající sekvencí nativního genu CryIA(b). Konstrukce uvedeného genu je popsána v příkladu 6, viz níže.

Je třeba vzít v úvahu, že za použití zde popsaných postupů lze zkonstruovat a testovat expresi řady hybridů tvořených syntetickou a nativní částí. Důležitým hlediskem při konstrukci hybridu je snaha o to, aby byl protein produkován v dostatečné množství pro kontrolu hmyzích škůdců. Tímto způsobem mohou být identifikovány kritické oblasti genu, a následně mohou být tyto oblasti syntetizovány za použití preferovaných kodonů. Syntetické sekvence mohou být spojeny s nativními sekvencemi jak je popsáno níže v příkladech provedení vynálezu. Obecně mohou být pro dosažení rozšířené exprese v rostlinách syntetizovány a substituovány v nativní kódující sekvenci N–koncové části nebo místa úprav.

Podle jiného provedení vynálezu lze geny optimalizované pro kukuřici kódující protein cryIA(b) upravovat tak, aby byla u kódovaného proteinu zajištěna vyšší tepelná stabilita nebo teplotní stabilita ve srovnání s nativním proteinem cryIA(b). Bylo uvedeno, že gen cryIA(b) nacházející se v *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD–1 obsahuje ve srovnání s proteiny cryIA(a) a cryIA(c) deleci o velikosti 26 aminokyselin, v polovině bližší k C–konci proteinu. Tato delece má za následek, že je protein cryIA(b) teplotně citlivý (viz M. Geiser, EP 0 440 581, s názvem „Temperaturstables *Bacillus thuringiensis*–Toxin“). Oprava této delece pomocí odpovídající oblasti z proteinu cryIA(a) nebo cryIA(c) zlepšuje teplotní stabilitu opraveného proteinu.

Konstrukty modifikovaného syntetického genu *cryIA(b)* o plné délce se vytvoří tak, aby se vložila sekvence kódující chybějící aminokyseliny na příslušné místo v sekvenci, aniž by se posunul čtecí rámec a aniž by se směnil zbytek proteinové sekvence. Syntetická verze genu o plné délce se sestaví pomocí syntézy řady dvouřetězcových DNA-kazet, z nichž každá má velikosti přibližně 300 bp, za použití standardních technik syntézy DNA a enzymatických reakcí. O opraveném genu se uvádí, že kóduje „tepelně stabilní“ nebo „teplotně stabilní“ protein *cryIA(b)*, jelikož si tento protein při vystavení vysokým teplotám udržuje vyšší biologickou aktivitu než jeho nativní protějšek. Specifické sekvence tepelně stabilních genů *cryIA(b)* optimalizovaných pro kukuřici, které kódují teplotně stabilní proteiny, jsou znázorněny na obrázku 9, 11, 13 a 15, a jsou též popsány níže v příkladu 7.

Vynález zahrnuje kódující sekvence optimalizované pro kukuřici, které kódují jiné polypeptidy, včetně jiných insekticidních proteinů z jiných zdrojů. Například lze optimalizovat pro kukuřici, a poté stabilně introdukovat do rostlin, zejména rostlin kukuřice, geny *cryIB*. Sekvence genu *cryIB* optimalizovaného pro kukuřici, zkonstruovaného v souladu s vynálezem, je znázorněna na obrázku 6.

Optimalizace genu insekticidního proteinu Bt pro expresi v kukuřici za využití kukuřici preferovaného užití kodonů podle vynálezu má za následek podstatné zvýšení exprese insekticidního genu. Předpokládá se, že za využití znalosti preferování kodonů rostlinami lze syntetizovat jiné geny pro zlepšení jejich exprese v kukuřici nebo jiných rostlinách. Využití znalosti preferování kodonů kukuřici je vhodný postup pro optimalizaci a maximalizaci exprese cizích genů v kukuřici. Mezi takovéto geny patří geny používané jako selektabilní markery nebo vyhodnocovací markery (scoreable markers) při transformaci kukuřice, geny, které poskytují rezistenci vůči herbicidům, geny, které poskytují rezistenci vůči chorobám, a další geny poskytující rezistenci vůči hmyzu.

Syntetický gen *cryIA(b)* též lze vložit do vektorů na bázi *Agrobacteria*, které jsou použitelné pro transformaci rozsáhlé řady druhů dvouděložných rostlin (viz příklad 44). Rostliny stabilně transformované vektory na bázi *Agrobacteria* obsahujícími syntetický *cryIA(b)* vykazují insekticidní aktivitu.

Nativní gen Bt *cryIA(b)* je dosti bohatý na obsah A + T. Obsah G + C v nativním genu Bt *cryIA(b)* o plné délce činí přibližně 39 %. Obsah G + C ve zkráceném nativním genu Bt *cryIA(b)* dlouhém zhruba 2 kb činí přibližně 37 %. Obecně platí, že kódující oblasti kukuřice bývají převážně bohaté na obsah G + C. Výsledkem modifikací provedených u genu Bt *cryIA(b)* je syntetická kódující oblast insekticidního proteinu, která má vyšší obsah G + C než 50 %, a je, pokud jde o DNA, přibližně z 65 % homologická s nativním genem *cryIA(b)*. Protein kódovaný tímto syntetickým genem *CryIA(b)* je 100% homologický s nativním proteinem, a uchovává si tedy z hlediska insekticidní aktivity plně svoji funkci. Zkrácený syntetický gen insekticidního proteinu *CryIA(b)* je dlouhý přibližně 2 kb a kóduje aktivní toxinovou oblast nativního insekticidního proteinu Bt kurstaki *CryIA(b)*. Protein kódovaný zkráceným syntetickým genem *CryIA(b)* obsahuje 648 aminokyselin.

Syntetické geny podle vynálezu jsou využitelné pro zvýšenou expresi v transgenických rostlinách, nejvýhodněji v transformované kukuřici. Transgenické rostliny podle vynálezu mohou být použity pro expresi insekticidního proteinu *CryIA(b)* ve velkém množství, která má za následek rezistenci vůči hmyzím škůdcům, výhodně vůči hmyzu z řádu brouků nebo motýlů, a nejvýhodněji vůči *Ostrinia nubilalis* a *Diatraea saccharalis*.

Podle vynálezu může být kódující sekvence DNA syntetického genu optimalizovaného pro kukuřici pod kontrolou regulačních elementů, jako jsou promotory, které řídí expresi kódující sekvence. Mezi takovéto regulační elementy patří například funkční promotory jednoděložných nebo kukuřice a jiných jednoděložných rostlin, zajišťující expresi genu v různých částech rostliny kukuřice. Tento regulační element může být konstitutivní, tj. takový, který vyvolává nepřetržitou

a stabilní expresi genu. Mezi takovéto promotory patří například, nikoliv však výlučně, promotor CaMV 35S, promotor CaMV 19S, promotory *Agrobacterium tumefaciens*, jako jsou promotory octopin–syntázy, promotory mannopin–syntázy, promotory nopalin–syntázy, nebo promotory jiných opin–syntáz, promotory ubiquitinu, promotory actinu, promotory histonu a promotory tubulinu. Regulačním elementem může být tkáňově preferovaný promotor, tj. takový, který způsobuje vyšší expresi v některých tkáních rostliny než v jiných tkáních. Výhodně mohou tkáňově preferované promotory řídit vyšší expresi syntetického genu v listech, stoncích, kořenech nebo/a pylu než v semenech. Regulační element může být též indukovatelný, například vystavením tepelnému stresu či vodnímu stresu, požerem hmyzem nebo chemickou indukci, nebo mohou být vývojově regulované. V oboru je známa řada promotorů, o jejichž expresi bylo zjištěno, že se mění tkáňově specifickým způsobem. Jedním z příkladů je fosfoenolpyruvát–karboxyláza (PEPC) kukuřice, která je specifická pro zelenou tkáň, viz například Hudspeth, R. L. a Grula J. W., *Plant Molecular Biology* 12: 579 – 589, 1989. Mezi další promotory specifické pro zelenou tkáň patří promotory proteinu vázajícího chlorofyl a/b a promotory malé podjednotky RubisCO.

Vynález též popisuje izolované a purifikované dřeňové preferované promotory. Výhodně dřeňové preferované promotory jsou izolované z travovitých jednoděložných rostlin, jako je cukrová třtina, rýže, pšenice, čirok, ječmen, žito a kukuřice, nejvýhodnější jsou dřeňové preferované promotory izolované z rostlin kukuřice.

Podle výhodného provedení je dřeňově preferovaný promotor izolován s rostlinného genu TrpA, podle nejvýhodnějšího provedení je izolován z genu TrpA kukuřice, tj. je to promotor, který je v nativním stavu operativně připojen k genu alfa podjednotky tryptofan–syntázy kukuřice (dále je označována „TrpA“). Kódovaný protein má molekulovou hmotnost přibližně 38 kD. Společně s další alfa podjednotkou a dvěma beta podjednotkami tvoří TrpA multimerní enzym tryptofan–syntázu. Každá z podjednotek může působit odděleně, ale společně pracují mnohem účinněji. TrpA katalyzuje přeměnu indol–glycerol–fosfátu na indol. Dosud nebyl ani gen TrpA kukuřice ani kódovaný protein izolován z žádné rostliny. Gen beta podjednotky tryptofan–syntázy *Arabidopsis thaliana* byl klonován jak popsali Wright a kol., *The Plant Cell*, 4: 711 – 719 (1992). Připravený gen TrpA kukuřice není homologický s genem kódujícím beta podjednotku.

Vynález též popisuje purifikované pylově specifické promotory, které lze získat z rostlinného genu kalcium–dependentní fosfát–kinázy (CDPK), tj. takové promotory, které jsou v nativním stavu operabilně spojeny s rostlinným genem CDPK. Podle výhodného provedení je promotor izolován z genu CDPK kukuřice. Termín „pylově specifický“ označuje stav, kdy k expresi operativně připojeného zajímavého strukturního genu dochází v podstatě výhradně (tj. v podstatě pouze) v pylu rostliny, a ve všech ostatních částech rostliny je exprese zanedbatelná. Termín „CDPK“ označuje rostlinný protein kinázu, který má vysokou afinitu vůči vápníku, ale nikoli vůči kalmodulinu, a vyžaduje pro svoji katalytickou aktivitu vápník, ale ne kalmodulin.

K získání tkáňově preferovaných nebo tkáňově specifických promotorů lze izolovat geny kódující tkáňově specifickou mediátorovou RNA (mRNA) pomocí odečítacího screeningu (differential screening) cDNA–knihovny. Například dřeňově preferovanou cDNA lze získat podrobením cDNA–knihovny dřeně odečítacímu screeningu za použití cDNA–sond získaných z mRNAs dřeně a semen, viz *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Sambrook a kol. eds. Cold Spring Harbor Press: New York (1989).

Alternativně lze tkáňově specifické promotory získat pomocí izolace tkáňově specifických proteinů, sekvenování jejich N–konce, syntézy oligonukleotidových sond a použití těchto sond ke screeningu cDNA–knihovny. Příklad takovýchto postupů popisující izolaci pylově specifického promotoru je uveden v experimentální části.

Do rozsahu vynálezu, pokud se týká dřeňově preferovaných pylově specifických promotorů, patří i funkčně aktivní fragmenty promotoru o plné délce, které jsou též schopné řídit dřeňově

preferovanou respektive pylově specifickou transkripci připojených strukturních genů. Funkčně aktivní fragmenty promotorové sekvence DNA lze získat z promotorové sekvence DNA pomocí různých v oboru známých postupů, jako je například pomocí štěpení promotorové sekvence DNA restričními enzymy, syntézy podle sekvence promotorové sekvence DNA, nebo je lze získat za použití technologie polymerázové řetězové reakce (PCR), viz například Mullis a kol., Meth. Enzymol. 155: 335 – 350 (1987), Erlich (ed.), PCR Technology, Stockton Press (New York 1989).

Do rozsahu vynálezu dále spadají též dřeňové preferované a pylově specifické promotory „ekvivalentní“ promotorům o plné délce, tzn., že mohou být v souladu se známými postupy modifikovány, přidány nebo odstraněny různé nukleotidy nebo skupiny nukleotidů, způsobem, který neodstraní promotorovou aktivitu.

Dřeňové preferovaný promotor získaný z genu TrpA kukuřice je znázorněn na obrázku 24. Odborníkovi je při znalosti této sekvence zřejmé, že lze dřeňové preferované promotory spadající do rozsahu vynálezu získat z jiných rostlin za použití zkoumání dřeňových knihoven z těchto rostlin pomocí sond odvozených od strukturního genu TrpA kukuřice. Výhodné jsou sondy vytvořené ze sekvencí, které jsou vysoce konzervativní mezi geny podjednotky TrpA různých druhů, jak je obecně rozebráno v příkladu 17. Další pylově specifické promotory, které jsou v nativním stavu spojeny s geny CDPK jiných rostlin než kukuřice, lze izolovat podobným způsobem za použití sond odvozených od konzervačních oblastí genu CDPK kukuřice, jejichž pomocí se zkoumají pylové knihovny.

Dalším provedením vynálezu je dřeňové preferovaný nebo pylově specifický promotor operabilně spojený se sekvencí DNA, tj. strukturním genem, kódujícím zajímavý protein, k vytvoření rekombinantní molekuly DNA nebo chimérického genu. Výraz „operabilně spojený s“ má význam známý v oboru a lze ho zaměnit za výrazy „operativně připojený k“, „spojený s“ nebo „fúzován s“.

Strukturní gen může být, pokud se týká původu promotoru nebo/a cílové rostliny, která jím je transformována, homologní nebo heterologní. Bez ohledu na vzájemný původ bude připojená sekvence DNA exprimována v transformované rostlině v souladu s vlastnostmi exprese promotoru, se kterým je spojena. Výběr připojené sekvence DNA by tedy měl vyplývat z požadavku na expresi dané sekvence tímto způsobem. Mezi příklady heterologních sekvencí DNA patří ty sekvence, které kódují insekticidní proteiny, například proteiny nebo polypeptidy toxické nebo inhibičně působící na hmyz nebo jiné členovce parazitující na rostlinách, nebo na rostlinné patogeny, jako jsou houby, bakterie a hád'átka. Tyto heterologní sekvence DNA kódují proteiny jako jsou magaininy, Zasloff, PNAS USA, 84: 5449 – 5453 (1987); cecropiny, Hultmark a kol., Eur. J. Biochem. 127: 207 – 217 (1982); attaciny, Hultmark a kol., EMBO J. 2: 571 – 576 (1983); melittin, gramicidin S, Katsu a kol., Biochem. Biophys. Acta, 939: 57 – 63 (1988); proteiny sodíkového kanálu a syntetické fragmenty, Oiki a kol. PNAS USA 85: 2395 – 2397 (1988); alfa toxin ze Staphylococcus aureus, Tobkes a kol., biochem., 24: 1915 – 1920 (1985); apolipoproteiny a jejich fragmenty, Knott a kol., Science 230: 37 (1985); Nakagawa a kol., J. Am. Chem. Soc., 107: 7087 (1985); alamethicin a řada syntetických amfipathických peptidů, Kaiser a kol., Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 16: 561 – 581 (1987); lectiny, Lis a kol., Ann. Rev. Biochem., 55: 35 – 68 (1986); inhibitory proteáz a amyláz; a insekticidní proteiny z Bacillus thuringiensis, zejména delta-endotoxiny z Bacillus thuringiensis; a z jiných bakterií nebo hub.

Podle výhodného provedení vynálezu je dřeňové preferovaný promotor získaný z genu podjednotky TrpA kukuřice nebo pylově specifický promotor získaný z genu CDPK kukuřice operabilně spojen s heterologní sekvencí DNA kódující insekticidní protein Bacillus thuringiensis („B.t.“). Tyto proteiny a odpovídající strukturní geny jsou v oboru dobře známé, viz Hofte a Whiteley, Microbial, Reviews 53: 242 – 255 (1989).

- Ačkoli je třeba vzít v úvahu, že může být použit libovolný promotor schopný řídit expresi, může být výhodné použít spíše než nativní promotor zajímavého proteinu heterologní promotory. Tímto způsobem lze zkonstruovat chimérické nukleotidové sekvence, které mohou být určeny na základě transformované rostliny, stejně jako hmyzího škůdce. Například pro kontrolu hmyzích škůdců kukuřice může být operabilně spojen s proteinem Bt promotor jednoděložné rostliny nebo kukuřice. Promotor kukuřice může být vybrán ze skupiny zahrnující tkáňově preferované a tkáňově specifické promotory, jako jsou dřeňově preferované respektive pylově specifické promotory, popsané zde.
- 10 V některých případech může být výhodné transformovat rostlinnou buňku více než jedním chimérickým genem. Tak může být například jediná rostlina transformována dřeňově preferovaným promotorem operabilně spojeným s proteinem Bt, jakož i pylově specifickým promotorem operabilně spojeným s proteinem Bt. Transformované rostliny budou exprimovat proteiny Bt v dřeni a pylu rostliny a v menším rozsahu v kořenech, vnějších obalech a opěrných kořenech.
- 15 Z řady dalších důvodů, zejména kvůli zabránění vzniku potenciální rezistence hmyzu vůči rostlinou exprimovaným insekticidním proteinům, je výhodné, aby byl ve stejné rostlině exprimován více než jeden insekticidní protein. Dva rozdílné geny (jako jsou dva rozdílné delta-endotoxiny získané z *Bacillus thuringiensis*, které se ve středním střevu cílového hmyzu vážou na rozdílné receptory) mohou být exprimovány ve stejných tkáních, nebo mohou být dva toxiny selektivně exprimovány v rozdílných tkáních stejné rostliny za použití tkáňově specifických promotorů. Expresí dvou genů Bt (nebo libovolných dvou insekticidních genů) ve stejné rostlině za použití tří rozdílných tkáňově specifických promotorů představuje problém z hlediska vytvoření rostliny exprimující požadovaný fenotyp. Při použití tří rozdílných promotorů řídících dva rozdílné geny je nutné do rostliny současně introdukovat šest rozdílných insekticidních genů. Pro transformaci je nutný též selektabilní marker pomáhající při identifikaci transformovaných rostlin. To znamená, že je do rostliny třeba introdukovat současně sedm rozdílných genů. Je nejlepší, aby byly všechny geny, zejména insekticidní geny, integrovány do rostlinného genomu na stejném lokusu, aby se chovaly jako jediný genový znak a nikoliv jako vícenásobný genový znak, který by bylo složitější sledovat během pěstování komerčních hybridů. Celkový počet genů může být snížen za použití diferencované tkáňově specifické exprese rozdílných insekticidních proteinů.
- 35 Například při fúzi cryIA(b) s pylovými promotory a promotory fosfoenolpyruvát-karboxylázy, dosáhne se exprese tohoto genu v zelených tkáních a pylu. Při fúzi dřeňově preferovaného promotoru s delta-endotoxinem cryIB z *Bacillus thuringiensis* se dosáhne exprese tohoto insekticidního proteinu v hojném množství v dřeni transformovaných rostlin, ale nikoli v tkáních semene. Transformací rostliny pomocí tří genů, promotor fosfoenolpyruvát-karboxylázy / cryIA(b), pylový promotor / cryIA(b), a dřeňový promotor / cryIA(b), se získá rostlina exprimující dva rozdílné insekticidní endotoxiny v rozdílných tkáních stejné rostliny. CryIA(b) bude exprimován ve „vnějších“ tkáních rostliny (zejména kukuřice), tj. v tkáních, kterými se *Ostrinia nubilalis* živí nejprve po vylíhnutí. Pokud by u *Ostrinia nubilalis* vznikla rezistence vůči cryIA(b) a hmyz by byl schopen zavrtat se po požití zelené tkáně nebo/a pylu do stvolu rostliny, setkal by se s delta-endotoxinem cryIB a byl by vystaven druhé insekticidní složce. Tímto způsobem lze dosáhnout diferencované exprese dvou rozdílných insekticidních složek ve stejné rostlině a snížit celkový počet genů, které je nutné zavádět jako jedinou genetickou jednotku, a přitom současně předcházet vzniku rezistence vůči jediné insekticidní složce.
- 45 Podobně může být rostlina transformována pomocí konstruktů kódujících více než jeden typ insekticidního proteinu pro kontrolu různých druhů hmyzu. Odborník tak může vytvořit řadu obměn.
- 50 Rekombinantní molekuly DNA podle vynálezu lze připravit pomocí manipulace s různými elementy tak, aby byly umístěny ve vhodné orientaci. Pro připojení k fragmentům DNA tak mohou být použity adaptory nebo linkery. Další manipulace mohou být prováděny kvůli vytvoře-
- 55

ní vhodných restrikčních míst a odstranění restrikčních míst nebo přebytkové DNA. Tyto manipulace lze provádět v oboru známými způsoby, viz Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, druhé vydání, 1989. Pro spojení a ligaci tak mohou být použity například postupy jako je restrikce, zpětné navázání nebo zaplnění
 5 přechýlujících konců pro vytvoření tupých konců, ligace linkerů a komplementárních konců DNA-fragmentů, viz Sambrook a kol., viz výše.

V závislosti na způsobu, kterým má být molekula začleněna do genomu cílové rostliny, může rekombinantní molekula DNA zahrnovat další funkční sekvence DNA. Například v případě
 10 transformace prostřednictvím *Agrobacteria*, pokud je k transformaci rostlinných buněk použit Ti- nebo Ri-plazmid, bude pravá a levá hranice T-DNA Ti- a Ri-plazmidu spojena jako lemovací oblast s expresní kazetou. Transformaci rostlin prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* popsali Horsch a kol., *Science*, 225: 1229 (1985), Marton, *Cell Culture Somatic Cell Genetics of Plants*, 1: 514 – 521 (1984), Hoekema, v: *The Binary Plant Vector System*
 15 Offset-Drukkerij Kanters B. V., Alblasterdam, 1985, kapitola V, Fraley a kol., *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 4: 1 – 46, a An a kol., *EMBO J.*, 4: 277 – 284 (1985).

Rekombinantní molekuly DNA podle vynálezu mohou též obsahovat markerový gen pro usnadnění selekce v rekombinantních rostlinných buňkách. Mezi příklady signálních znaků
 20 (markerů) patří rezistence vůči biocidům jako jsou antibiotika, například kanamycin, hygromycin, chloramfenikol, paramomycin, methotrexat a bleomycin, nebo herbicidům jako jsou imidazolony, sulfonylmočoviny, glyfosat, fosfinothricin nebo bialafos. Markerové geny jsou známé v oboru.

Dalším provedením vynálezu jsou rostliny stabilně transformované pomocí rekombinantní molekuly DNA nebo chimérického genu, jak jsou popsány výše. Výsledná transgenická rostlina obsahuje ve svém genomu stabilně začleněný transformovaný gen a exprimuje strukturní gen operabilně připojený příslušným způsobem k promotoru.

30 Mezi transgenické rostliny podle vynálezu patří jak jednoděložné, tak dvouděložné rostliny. Mezi reprezentativní příklady patří kukuřice, tabák, rajče, bavlník, řepka, sója, pšenice, rýže, vaječná, brambor a slunečnice. Mezi výhodné rostliny patří kukuřice, zejména inbrední rostliny kukuřice.

Všechny transformované rostliny spadající do rozsahu vynálezu lze připravit různými způsoby známými v oboru. Transformace prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* byla popsána výše.
 35 Mezi další postupy patří přímý transfer genu do protoplastů, Paszkowski a kol., *EMBO J.*, 12: 2717 (1984), Loez a kol., *Mol. Gen. & Genet.*, 1199: 178 (1985), Fromm a kol., *Nature* 319: 719 (1986); bombardování mikroprojektily, Klein a kol., *Bio/Technology*, 6: 559 – 563 (1988); injekce do protoplastů, kultivovaných buněk nebo tkání, Reich a kol., *Bio/Technology*, 4: 1001 – 1004 (1986); nebo injekce do meristematických tkání nebo semenáčků a rostlin jak
 40 popsali De La Pena a kol., *Nature*, 325: 274 – 276 (1987), Graves a kol., *Plant Mol. Biol.*, 7: 43 – 50 (1986), Hoykaas – Van Slogteren a kol., *Nature*, 311: 763 – 764 (1984), Grimsley a kol., *Bio/Technology*, 6: 185 (1988), a Grimsley a kol., *Nature*, 325: 177 (1988) a elektroporace, WO92/09696.

45 Typ exprese strukturního genu operativně připojeného k připravenému tkáňově preferovanému nebo tkáňově specifickému promotoru v transformované rostlině obsahující stejný promotor je klíčový v případě, že strukturní gen kóduje insekticidní protein. Například právě popsáný dřevěně preferovaný typ exprese umožňuje transgenické rostlině tolerovat a odolávat patogenům
 50 a herbivorům, kteří napadají primárně dřev, ale též opěrné kořeny, vnější obaly a listy rostliny, jelikož protein je v těchto rostlinných částech exprimován v menším rozsahu, ale stále v množství kontrolujících hmyz, ale v případě obou typů promotorů nebudou ovlivněna semena rostliny.

Příklady provedení vynálezu

Materiál a postupy používané při provádění vynálezu jsou dále popsány následujícími příklady provedení vynálezu. Tyto příklady jsou uvedeny pouze pro ilustraci a v žádném směru neomezuji rozsah vynálezu.

Příklad 1

Obecné postupy

Manipulace s DNA se provádějí za použití postupů standardních v oboru. Tyto postupy lze často modifikovat nebo/a nahradit, aniž by se podstatně změnil výsledek. Pokud není uveden jiný odkaz, je většina těchto postupů popsána v práci Sambrook a kol., Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, druhé vydání, 1989.

Syntéza DNA-oligomerů:

DNA-oligomery dlouhé od přibližně dvaceti do přibližně devadesáti, s výhodou od přibližně šedesáti do přibližně osmdesáti nukleotidů, se syntetizují za použití DNA-syntetizátoru Applied Biosystems model 380B podle standardních postupů. Oligomery se připraví za použití zmodernizovaného cyklu SSCAF3 na 0,2 μ mol malorozsahové koloně ABI s širokými póry. Na konci postupu se vyplaví trityl a oligomer se odštěpí od kolony za využití automatického štěpícího cyklu v přístroji 380B. Oligomery se poté odblokují v nadbytku hydroxidu amonného při teplotě 55 °C po dobu 8 až 12 hodin. Poté se oligomery vysuší v odpařovacím přístroji používajícím plynný dusík. Po vysušení se oligomery převedou do suspenze v 0,25 až 0,5 ml deionizované vody.

Purifikace syntetických oligomerů:

Vzorek každého oligomeru se smíchá se stejným objemem směsi barviva a formamidu, kde výsledný roztok obsahuje 0,05 % bromfenolové modři, 0,05 % xylenkyanolu FF a 25 % formamidu. Směs se zahřívá po dobu 10 minut na teplotu 95 °C, aby se oligomery denaturovaly. Vzorky se poté aplikují na 12% polyakrylamido-močovinný gel obsahující 7 M močoviny (Sambrook a kol.). Po elektroforéze při 300 až 400 voltů po dobu 3 až 4 hodin za použití přístroje Vertical Slab Gel Unit (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Kalifornie), se pro lokalizaci fragmentu o správné velikosti v gelu použije UV světlo, a tento fragment se poté vyřízne žiletkou. Purifikovaný fragment gelu se rozmělní a inkubuje v pufru tvořeném 0,4M chloridem lithným a 1mM kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA), o pH 8, přes noc při teplotě 37 °C.

K separaci oligomerů ze zbytků polyakrylamidového gelu se použijí buď filtrační jednotky z porézního polyethylenu Gene/X (25 μ M), nebo filtrační jednotky Millipore ultrafree-MC (0,45 μ M). Purifikované oligomery se vysráží ethanolem, izolují pomocí centrifugace v mikrocentrifuze po dobu 20 minut při 4 °C a nakonec opět převedou do suspenze v TE (10mM Tris, 1mM kyselina ethylendiamintetraoctová, pH 8,0). Koncentrace se upraví na 50 ng / μ l na základě měření absorpce při 260 nm.

Kinasování oligomerů pro stanovení velikosti

Pro ověření velikosti některých oligomerů na sekvenčním gelu se provede pomocí kinázy značící reakce za použití purifikovaných syntetických oligomerů o každé z následujících velikostí: 40-merů, 60-merů, 70-merů, 80-merů a 90-merů. Pro každou kinasovací reakci probíhající v objemu 20 μ l se použije 1 pmol purifikovaného oligomeru v pufru, který tvoří 7,0 mM Tris o pH 7,5, 10 mM chloridu draselného a 1 mM chloridu hořečnatého, 0,5 mM

dithiothreitolu (DTT), 50 µg / ml N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA), 3000 µCi (3 pmoly) 32P-gammaATP, a 8 jednotek T4 polynukleotid-kinázy. Směs pro kinasovací reakci se inkubuje po dobu 1 hodiny při 37 °C, následuje extrakce směsí fenolu a chloroformu a třikrát vysrážení ethanolom za použití glykogenu jako nosiče (Tracy, Prep. Biochem. 11: 251 – 268 (1981)).

5

Z každé reakční směsi se připraví s 25 % formamidem, 0,05 % bromfenolové modři a 0,05 % xylenkyanolu FF dvě dávky pro nanesení na gel (jedna z nich obsahuje množství vydávající 1000 pulzů za minutu (cpm), druhá 2000 pulzů za minutu). Kinasované oligomery se vaří po dobu 5 minut před nanesením na sekvenační gel obsahující 6 % polyakrylamidu a 7 M močoviny (BRL Gel Mix TM6, BRL, Gaithersburg, Maryland). Na stejném gelu se provádí sekvenační reakce plazmidu pUC18, pro zajištění velikostních markerů.

10

Po elektroforéze se gel vysuší a exponuje na diagnostický film citlivý na paprsky X (Kodak, X-OMAT AR). Výsledné autoradiografy ukazují, že všechny testované purifikované oligomery mají správnou velikost. U oligomerů, jejichž velikost nebyla zjišťována přímo na sekvenčním gelu, se tato velikost zjistí na gelu s 6 % polyakrylamidu a 7 M močoviny (BRL Gel Mix TM6), za použití již velikostně určených oligomerů jako velikostních markerů. Všechny oligomery se před nanesením na gel nejprve denaturují 25% formamidem při teplotě 100 °C po dobu 5 minut. Obarvení polyakrylamidového gelu ethidium-bromidem umožňuje vizualizaci všech oligomerů pro stanovení velikosti.

20

Hybridizace oligomerů pro přímé klonování:

Oligomery, které mají být hybridizovány se spojí dohromady (od 1 µg do 20 µg celkové DNA) a kinazují v 1X ligačním pufru (Promega), obsahujícím 30 mM Tris-HCl o pH 7,8, 10 mM chloridu hořečnatého, 10 mM dithiothreitolu a 1 mM dATP. K reakci se použije 1 až 20 jednotek T4 polynukleotid-kinázy, v závislosti na přítomném množství celkové DNA. Kinasovací reakce se zastaví umístěním reakční nádoby do vařící vodní lázně na dobu pěti minut. Oligomery, které mají vytvořit 5'-konce hybridizovaných molekul se nekinasují, ale přidají se ke kinasovaným oligomerům po zahřátí společně s dalším hybridizačním pufrem. Spojené oligomery jsou v objemu 50 až 100 µl s přidaným hybridizačním pufrem použitým kvůli upravení konečného obsahu solí na 100 mM chloridu sodného, 120 mM Tris pH 7,5 a 10 mM chloridu hořečnatého. Kinasované a nekinasované oligomery se spojí dohromady a zahřívají se ve vařící vodní lázni po dobu pěti minut a poté se nechají pomalu ochladit na teplotu místnosti v průběhu přibližně čtyř hodin. Hybridizované oligomery se poté extrahují směsí fenolu a chloroformu, vysráží ethanolom a znovu převedou do suspenze v 17 µl TE (10 mM Tris, 1 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové, pH 8,0). Za použití těchto 17 µl se sestaví směs pro ligační reakci o konečném objemu 20 µl (konečné podmínky: 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM chloridu hořečnatého, 10 mM dithiothreitolu, 1 mM ATP, a 3 jednotky T4 DNA-ligázy (Promega, Madison, Wisconsin). Ligační směs se nechá inkubovat po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Hybridizované a ligované fragmenty se předtím, než se klonují do vektorů, obecně purifikují na 2% Nusieve-gelech před nebo/a po rozštěpení restričními enzymy. Sestaví se směs pro ligační reakci o objemu 20 µl za použití 100 ng až 500 ng každého z fragmentů s přibližně ekvimolárním množstvím DNA v 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM chloridu hořečnatého, 10 mM dithiothreitolu, 1 mM ATP a 3 jednotkami T4 DNA-ligázy (Promega, Madison, Wisconsin). Ligační směs se inkubuje při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Po ligaci se DNA za použití standardních postupů (Sambrook a kol.) transformuje do zmrazených kompetentních buněk *Escherichia coli*, a selekce transformovaných buněk se provede na LB-agaru (Sambrook a kol.) obsahujícím ampicillin v množství 100 µg / ml (viz níže).

50

Polymerázové řetězové reakce (PCR-reakce) pro screening klonů v *Escherichia coli*:

Kolonie *Escherichia coli*, které obsahují správný DAN-inzert se identifikují za použití polymerázové řetězové reakce (PCR) (viz obecně, Sandhu a kol., BioTechniques 7: 689 – 690

(1989)). Za použití párátka se kolonie seškrábnou z desek, kde se ponechaly růst přes noc, a přidají se do reakční směsi pro polymerázovou řetězovou reakci o objemu 20 µl až 45 µl, která obsahuje přibližně 50 pmolů každého hybridizačního primeru (viz například použití primerů MK23A28 a MK25A28 pro selekci orientace SacII–fragmentu v pHYB2#6), 200 µM až 400 µM každého dNTP a 1X reakční pufr (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut). Po varu směsi pro polymerázovou řetězovou reakci s *Escherichia coli* ve vařící vodní lázni po dobu 10 minut se přidá 5 µl Taq polymerázy (0,5 jednotek) (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut) v 1X reakčním pufru. Parametry polymerázové řetězové reakce jsou obecně stanoveny takto: denaturace při 94 °C po dobu 30 sekund, teplotní hybridizace při 55 °C po dobu 45 sekund a extenze při 72 °C po dobu 45 sekund, při 30 až 36 cyklech. Produkty polymerázové řetězové reakce se analyzují na agarózovém gelu nebo Nusieve–agarózovém gelu pro stanovení délky amplifikovaných fragmentů.

Ligace:

Fragmenty rozštěpené restrikčními enzymy se purifikují buď na 1% agaróze s nízkou teplotou gelovatění (LGT, low gelling temperature agarose (FMC)), 2% Nusieve–agaróze (FMC), nebo 0,75% agaróze za použití postupů standardních v oboru. Pásky DNA se vizualizují ethidium–bromidem a tyto pásky se izolují z gelů pomocí vyříznutí žiletkou. Fragmenty izolované z agarózy s nízkou teplotou gelovatění se ligují přímo v LGT. Deset mikrolitrů každého izolovaného fragmentu DNA se použije pro sestavení směsi pro ligační reakce, při konečných objemech směsi pro ligační reakce přibližně 23 µl. Po vyříznutí žiletkou se izolované pásky gelu obsahující požadované fragmenty DNA rozpustí a přenesou do 1X ligačního pufru, a přidají se 3 jednotky T4 DNA–ligázy (Promega), jak je popsáno výše. Fragmenty izolované buďto z běžné agarózy, nebo Nusieve–agarózy se purifikují z agarózy za použití filtračních jednotek Millipore ultrafree–MC (45 µM) a fragmenty se ligují jak je popsáno výše. Směs pro ligační reakci se před transformací zmražených kompetentních buněk *Escherichia coli* za použití standardních postupů (Sambrook a kol.) inkubuje při teplotě místnosti po dobu dvou hodin.

Transformace:

Zmražené kompetentní buňky *Escherichia coli* kmenu DH5alfa nebo HB101 se připraví a transformují za použití standardních postupů (Sambrook a kol.). Kompetentní buňky *Escherichia coli* „SURE“ se získají od firmy Stratagene (La Jolla, Kalifornie). U ligací prováděných v agaróze s nízkou teplotou gelovatění se po dokončení ligační reakce směs doplní 50mM chloridem vápenatým na konečný objem přibližně 150 µl a roztok se zahřívá na teplotu přibližně 65 °C po dobu zhruba 10 minut, aby se agaróza zcela rozpustila. Roztok se poté promíchá a chladí na ledu po dobu přibližně 10 minut, a poté se přidá přibližně 200 µl kompetentních buněk, které byly rozmrazeny na ledu. Tato směs se nechá inkubovat na ledu po dobu 30 minut. Směs se poté podrobí tepelnému šoku teplotou 42 °C působící po dobu 60 sekund, a poté se směs chladí na ledu po dobu 2 minut. Poté se přidá 800 µl média SOC (20% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10mM chlorid sodný, 2,5mM chlorid draselný, upraveno na pH 8 5N hydroxidem sodným, 20mM směs chloridu hořečnatého a síranu hořečnatého, a 20mM glukóza, Sambrook a kol.) a buňky se inkubují při teplotě 37 °C za třepání po dobu přibližně 1 hodiny před nanesením na desky se selekčním médiem. Deskami je typicky L–agar (Sambrook a kol.) obsahující ampicillin v množství 100 µg / ml.

Pokud se ligace provádějí v roztoku bez agarózy, rozmrazí se na ledu typicky 200 µl zmražených kompetentních buněk *Escherichia coli* (kmen DH5alfa (BRL, Gaithersburg, Maryland) nebo buňky „Sure“ (Stratagene, La Jolla, Kalifornie)) a přidá se 5 µl ligační směsi. Reakční směs se inkubuje na ledu po dobu přibližně 45 až 60 minut, a buňky se poté podrobí tepelnému šoku teplotou 42 °C působící po dobu přibližně 90 sekund. Po regeneraci při teplotě místnosti po dobu přibližně 10 minut se přidá 800 µl média SOC a buňky se poté inkubují po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C za třepání a nanesou na desky, jak je uvedeno výše.

Při vyhledávání inzertů do genu beta-galaktosidázy v některých standardně používaných vektorech se nanese 200 μ l regenerované transformační směsi na desky LB-agaru obsahujícího 0,008% X-gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid), 80 μ M izopropyl-beta-thiogalaktosid (IPTG) a ampicillin v koncentraci 100 μ g / ml (Sambrook a kol.). Desky se inkubují při teplotě 37 °C přes noc, aby byla umožněna selekce a růst transformantů.

Miniscreening DNA:

Transformanty z desek se selekčním médiem se nechají růst a struktura jejich plazmidů se zkoumá a potvrdí za použití standardních postupů miniscreeningu plazmidů (Sambrook a kol.). Typicky se k produkci malých množství plazmidové DNA pro analýzu používá postup využívající varu (tzv. „boiling“ procedure) (Sambrook a kol.). Alternativně se v některých případech používá postup využívající octanu amonného. Tento postup je modifikací postupu, který popsali Shing-yi Lee a kol., Biotechniques 9: 676 – 679 (1990).

1) Jediná bakteriální kolonie ze selekčních desek ponechaných růst přes noc se inokuluje do 5 ml (může se snížit na 1 ml) TB-média (Sambrook a kol.) a nechá se růst v přítomnosti příslušného antibiotika.

2) Inkubace se provádí za otáčení přes noc při teplotě 37 °C.

3) Do umělohmotné zkumavky (Oakridge) se odebere 5 ml bakteriálních buněk a centrifugují se po dobu 5 minut při 5000 otáčkách za minutu na přístroji Sorvall SS-34 při teplotě 4 °C.

4) Supernatant se odstraní.

5) Peleta se znovu převede do suspenze v 1 ml lysního pufru (50mM glukóza, 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM kyselina ethylendiamintetraoctová a 5 mg / ml lysozymu), promíchá se po dobu 5 sekund a inkubuje při teplotě místnosti po dobu 5 minut.

6) Přidají se 2 ml čerstvě připraveného alkalického roztoku (0,2N hydroxid sodný, 1% natrium-dodecylsulfát), pevně se uzavře víčko, směs se promíchá pětinasobným obrácením zkumavky a zkumavka se umístí na dobu 5 minut do lázně obsahující led a vodu.

7) K roztoku se přidá 1,5 ml 7,5M octanu amonného o teplotě ledu (pH 7,6), směs se promíchá pětinasobným jemným obrácením zkumavky a zkumavka se umístí na dobu 5 minut do lázně obsahující led a vodu.

8) Směs se centrifuguje při 9000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při teplotě místnosti.

9) Čirý supernatant se přenese do zkumavky Corex o objemu 15 ml, přidá se 0,6-násobek objemu izopropanolu (přibližně 2,5 ml) a směs se nechá usadit při teplotě místnosti po dobu 10 minut.

10) Směs se centrifuguje při 9000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při teplotě místnosti a supernatant se odstraní.

11) Peleta se opět převede do suspenze v 300 μ l TE-pufu a přidá se 6 μ l zásobného roztoku RNasy A a T1 (připraveného jako 200 μ l roztoku smícháním 180 μ l RNasy A (3254 jednotek / mg proteinu, 5,6 mg proteinu / ml) a 20 μ l RNasy T1 (481 jednotek / μ g proteinu, 1,2 mg proteinu / ml). Tyto zásobní roztoky lze získat od firmy USB (US Biochemical). Směs se přenese do mikrocentrifugační kyvety a inkubuje při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.

12) Přidá se 75 µl destilované vody a 100 µl 7,5M octanu amonného a směs se inkubuje po dobu 10 minut na lázni obsahující led a vodu.

5 13) Směs se centrifuguje při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut v mikrocentrifuze (Beckman) při teplotě 4 °C.

14) Proveďte se vysrážení pomocí přidání 2,5-násobku objemu 100% ethanolu (přibližně 1 ml) a směs se inkubuje na lázni obsahující led a vodu po dobu 10 minut.

10 15) Směs se centrifuguje při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut v mikrocentrifuze.

16) Peleta se promyje 0,5 ml až 1 ml 70% ethanolu, vysuší se a převede opět do suspenze ve 100 µl 1X pufru New England Biolabs restriction enzyme Buffer 4 (20 mM Tris-HCl (pH 7,9), 10 mM octanu hořečnatého, 50 mM octanu draselného, 1mM dithiothreitolu). Spektrofotometricky se změří koncentrace a zkontroluje čistota pomocí absorbance při 260 a 280 nm.

20 Pro rychlejší stanovení, zda konkrétní bakteriální kolonie obsahuje nebo neobsahuje rekombinantní plazmid, se provede miniscreening pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR miniscreen) za použití modifikace postupu, který popsali Sandhu, G. S. a kol., 1989, BioTechniques, 7: 689 – 690). Ve stručnosti, připraví se směs následujícího složení:

100 µl výše uvedené směsi primerů, 20 µM každého primeru.

25 100 µl směsi dNTP (2,5 mM každého deoxyribonukleotidtrifosfátu),

100 µl 10X pufru AmpliTaq buffer (Perkin-Elmer Cetus, 1X pufr = 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM chloridu draselného, 1,5 mM chloridu hořečnatého a 0,01 % želatiny),

30 700 µl deionizované vody.

20 µl výše uvedené směsi se vloží do polypropylenové zkumavky pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Transformovaná bakteriální kolonie se odebere párátkem a převede do suspenze v této směsi. Zkumavka se vloží do vařicí vodní lázně na dobu 10 minut, ochladí se na teplotu místnosti a poté se přidá 5 µl směsi níže uvedeného složení:

35 265 µl deionizované vody,

30 µl 10X pufru AmpliTaq buffer (Perkin-Elmer Cetus, 1X pufr = 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM chloridu draselného, 1,5 mM chloridu hořečnatého a 0,01 % želatiny),

40 7,5 µl Tq polymerázy.

Vzorky se překryjí 50 µl minerálního oleje a provede se 30 cyklů polymerázové řetězové reakce s následujícími parametry:

45 denaturace: 94 °C po dobu 1 minuty,

teplotní hybridizace: 55 °C po dobu 1 minuty,

50 extenze: 72 °C po dobu 45 sekund.

Po amplifikaci pomocí polymerázové řetězové reakce se přidá do celého objemu reakční směsi 1 µl barviva (30 % glycerolu, 0,25 % bromfenolové modři, 0,25 % xylenkyanolu) a 20 µl směsi

se nanese na gel (2 % Nusieve, 1 % agarózy), aby se zjistilo, zda je přítomen produkt polymerázové řetězové reakce o očekávané velikosti.

- 5 Tento postup se používá pouze jako počáteční screening. Následně se pro potvrzení struktury plazmidu a jeho inzertu provedou minipreparační postupy, a následně sekvenování.

Příklad 2

10 Amplifikace a sestavení každé čtvrtiny

Klonování fragmentů syntetického genu Bt cryIA(b):

- 15 Syntetický gen se vytvoří tak, aby byl klonován do čtyř dílů, z nichž každý tvoří zhruba jednu čtvrtinu genu. Oligomery pro každou čtvrtinu se spojí, aby se sestavily buď pomocí polymerázové řetězové reakce, hybridizace, nebo kombinace hybridizace následované amplifikací za použití polymerázové řetězové reakce, jak je popsáno na libovolném místě. Syntetické čtvrtiny se spojí dohromady pomocí překrývajících se restrikčních míst Aat II, Nco I, a Apa I mezi první a druhou, druhou a třetí, respektive třetí a čtvrtou čtvrtinou.

- 20 Každá čtvrtina genu (představující přibližně 500 bp) se sestaví hybridizací příslušných oligomerů a amplifikací požadovaného fragmentu za použití primerů pro polymerázovou řetězovou reakci specifických pro konce této čtvrtiny. Použijí se dva odlišné způsoby uspořádání polymerázových řetězových reakcí užívající dvě sady mírně odlišných primerů. PCR-produkty těchto dvou reakcí se vytvoří tak, že jsou identické s tím rozdílem, že v první reakci je na 5'-konci kódující oblasti 25 přídatná sekvence AATT a ve druhé reakci je na 3'-konci dané čtvrtiny sekvence AGCT. Když se produkty těchto dvou reakcí pro konkrétní čtvrtinu smíchají (po odstranění polymerázy, primerů a neúplných produktů), denaturují a následně znovu tepelně hybridizují, má určitý podíl (teoreticky 50 %) tepelně hybridizovaného produktu nehomologní přečnávající konce. Tyto konce se vytvoří tak, aby odpovídaly lepivým koncům vytvořeným během restrikčního štěpení EcoRI 30 na 5'-konci a Hind III na 3'-konci molekuly. Výsledné molekuly se fosforylují, ligují do vektoru Bluescript rozštěpeného EcoRI a HindIII a fosfatázovaného, a transformují do zmrazeného kompetentního kmene *Escherichia coli* DH5alfa. Po selekci se kolonie *Escherichia coli* obsahující požadovaný fragment identifikují pomocí způsobů restrikčního štěpení DNA. Inzerty, 35 které představují části syntetického genu, se následně purifikují a sekvenují za použití standardních postupů. Ve všech případech se vyrobí a sekvenují klony z více polymerázových řetězových reakcí. Čtvrtiny se poté navzájem spojí za použití jedinečných restrikčních míst na místech spojení, čímž se získá kompletní gen.

- 40 Klonované čtvrtiny se identifikují pomocí miniscreeningu a fragmenty genu se sekvenují. Do sekvence se často zavedou chyby, nejpravděpodobněji během amplifikace v polymerázové řetězové reakci. K opravě těchto chyb v klonech, které jich obsahují pouze několik, se použijí hybridizované oligomery. Hybridizované fragmenty se rozštěpí na rozpoznávacím místě pro restrikční enzym v fragmentu a klonují, aby se nahradila zmutovaná oblast v syntetickém genu. 45 Délka hybridizovaných fragmentů činí od 90 bp (například v případě oblasti, která nahrazuje fragment mezi místy Sac II v druhé čtvrtině) až do přibližně 350 bp v případě fragmentu čtvrté čtvrtiny, který nahrazuje dvě mutace vzniklé při polymerázové řetězové reakci ve čtvrté čtvrtině genu.

- 50 Kvůli vysokému výskytu chyb po polymerázové řetězové reakci se vytvoří a zkonstruuje plazmid, který umožňuje selekci klonovaného fragmentu genu, který obsahuje otevřený čtecí rámec. Tento plazmid se vytvoří takovým způsobem, že, pokud je do klonovacích míst zaveden otevřený čtecí rámec, může transformovaná bakterie růst v přítomnosti kanamycinu. Konstrukce tohoto vektoru je podrobně popsána níže. Tento selekční systém vysoce urychluje postup, jelikož 55 umožňuje rychle identifikovat klony s otevřenými čtecími rámci, aniž by se musel sekvenovat

velký počet nezávislých klonů. Syntetické čtvrtiny se sestaví v různých plazmidech, včetně BSSK (Stratagene, La Jolla, Kalifornie), pUC18 (Sambrook a kol.), a Km–expresivního vektoru (expresivního vektoru exprimujícího kanamycin). Další vhodné plazmidy, včetně plazmidů na bázi pUC, jsou známy v oboru a lze je též použít. Získání plně funkčních syntetických genů Bt cryIA(b) se ověří pomocí úplného sekvenování klonovaných fragmentů, analýzy produktů klonovaných genů pomocí western blottingu a biologických testů s hmyzem za použití *Ostrinia nubilalis* jako testovacího hmyzu.

Konstrukce Km–expresivního vektoru pro selekci otevřených čtecích rámců:

Km–expresivní vektor se vytvoří pro selekci fragmentů syntetického genu, které obsahují otevřené čtecí rámce. Pomocí polymerázové řetězové reakce se vytvoří oligomery, které umožňují fúzi genu NPTII z Tn5 počínaje nukleotidem 13 (Reiss a kol., EMBO J. 3: 3317 – 3322 (1984)) s pUC18 a zavedení vhodných restrikčních míst mezi segmenty DNA. Oblast polylinkeru obsahuje rozpoznávací místa pro restrikční endonukleázy, která umožňují klonování různých syntetických fragmentů insekticidních proteinů Bt ve stejném rámci s genem Km. 5'–oligomer o velikosti 88 bp, který obsahuje oblast polylinkeru, se purifikuje na 6% polyakrylamidovém gelu, jak je popsáno výše pro purifikaci oligomerů pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Polymerázová řetězová reakce se provede za použití fragmentu Bgl II / Sma I o velikosti 1 kb, který obsahuje gen NPT II získaný z Tn5, jako matrice. Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci obsahuje 100 ng matrice se 100 pmoly oligomerů KE72A28 a KE74A28 (viz sekvence níže), 200 nM dNTP, a 2,5 jednotky Taq polymerázy v celkovém objemu 50 µl, při překrytí stejným objemem minerálního oleje. Sekvence primerů jsou:

KE74A28

**5' –GCAGATCTGG ATCCATGCAC GCCGTGAAGG GCCCTTCTAG AAGGCCTATC
GATAAAGAGC TCCCCGGGGA TGGATTGCAC GCAGGTTC–3'**

KE72A28

5' –GCGTTAACAT GTCGACTCAG AAGAACTCGT CAAGAAGGCG–3'

Parametry použité polymerázové řetězové reakce jsou: 94 °C po dobu 45 sekund, 55 °C po dobu 45 sekund, a 72 °C po dobu 55 sekund s prodloužením ve stupni 3 o 3 sekundy při 20 cyklech. Všechny polymerázové řetězové reakce se provádí v teplotním cyklovači Perkin–Elmer Cetus. Amplifikovaný produkt polymerázové řetězové reakce má velikost 800 bp a obsahuje oblast polylinkeru s místem počátku translace následovaným jedinečnými restrikčními místy fúzovanými ve stejném čtecím rámci s genem Km od báze č. 13 přes terminátor translace. pUC:KM74 je Km–expresivní kazeta, která se sestaví z fragmentu Bgl II / Sall polylinker / Km o velikosti 800 bp klonovaného do vektoru pUC18. Promotor lacZ umožňuje, aby byl gen Km exprimován v *Escherichia coli*. Deriváty pUX:KM74 se musí nejprve nanést na desky LB–agaru obsahující ampicillin v množství 100 µg / ml, aby se provedla selekce transformantů, které mohou být následně vyhledávány na deskách LB–agaru obsahujících 25 µg / ml směsi kanamycinu a izopropyl–beta–thiogalaktosidu (IPTG). Fragmenty syntetického genu insekticidního proteinu Bt se sestaví z každé čtvrtiny v Km–kazetě, aby se ověřilo klonování částí fragmentů obsahujících otevřené čtecí rámce. Prvním fragmentem syntetického genu insekticidního proteinu Bt aktivním proti *Ostrinia nubilalis*, pBt:Km#6, je gen insekticidního proteinu Bt, který vykazuje rezistenci vůči Km. Následně se zjistí, že tento fragment obsahuje mutace ve třetí a čtvrté čtvrtině, které se později opraví.

Příklad 2A

Syntéza a klonování první čtvrtiny syntetického genu (páry bází 1 až 550)

- 5 Za účelem klonování první čtvrtiny syntetické sekvence DNA kódující syntetický gen Bt cryIA(b) se provede následující postup. V podstatě stejné postupy se použijí pro syntézu a klonování dalších čtvrtin, s tím, že se liší primery a restrikční místa, jak je uvedeno.

10 Matrice pro čtvrtinu 1: směs purifikovaných oligomerů U1 – U7 a L1 až L7 ve stejných množstvích.

Primery pro polymerázovou řetězovou reakci:

Přímé:

P1 (a) : 5'-GTCGACAAGG ATCCAACAAT GG-3'

15 P1 (b) : 5'-AATTGTCGAC AAGGATCCAA CAATGG-3'

Obrácené:

P2 (a) : 5'-ACACGCTGAC GTCGCGCAGC ACG-3'

P2 (b) : 5'-AGCTACACGC TGACGTCGCG CAG-3'

Pár primerů A1: P1(b) + P2(a)

20 Pár primerů A2: P1(a) + P2(b)

Směs pro polymerázovou řetězovou reakci, která obsahuje oligomery tvořící první čtvrtinu syntetického genu insekticidního proteinu Bt optimalizovaného pro kukuřici se připraví následovně:

25 200 ng směsi oligomerů (všechny oligomery pro tuto čtvrtinu smíchané ve stejných hmotnostních množstvích),

30 10 µl směsi primerů (směs 1 : 1 každého primeru při koncentraci 20 µM, primery jsou popsány výše),

5 µl 10X pufru pro PCR.

Použitým pufrem pro PCR může být buď:

35 (a) 1X koncentrace = 10 mM chloridu draselného, 10 mM síranu amonného, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM síranu hořečnatého a 0,1 % Tritonu X-100, nebo

40 (b) 1X koncentrace = 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM chloridu draselného, 1,5 mM chloridu hořečnatého, 0,01 % (hmotnost / objem) želatiny.

Složky se smíchají, zahřívají ve vařící vodní lázni po dobu 5 minut a inkubují při 65 °C po dobu 10 minut.

Poté se přidají následující činidla:

8 µl směsi dNTP (konečná koncentrace v reakční směsi = 0,2 mM každého deoxyribonukleotidtrifosfátu),

5

5 jednotek polymerázy.

Konečný objem reakční směsi činí 50 mikrolitrů.

- 10 Oligomery se inkubují po dobu 3 minut při teplotě 72 °C a poté se nechá proběhnout polymerázová řetězová reakce, která se provádí v teplotním cyklovači Perkin Elmer.

Jednotlivé kroky cyklu jsou následující:

15

denaturace: 94 °C po dobu 1 minuty,

teplotní hybridizace: 60 °C po dobu 1 minuty,

extenze: 72 °C po dobu 45 sekund (+ 3 sekundy na cyklus),

20

počet cyklů: 15.

- Po dokončení reakce se 10 µl reakční směsi polymerázové řetězové reakce nanese na analytický gel obsahující 2 % Nusieve-GTG (FMC) a 1 % agarózy, pro zmonitorování reakce. Zbýlých 40 µl se použije pro klonování fragmentů genu, jak je popsáno níže.

25

Produkty polymerázové řetězové reakce

- 30 Znázorněny jsou konce dvouřetězcových produktů polymerázové řetězové reakce odpovídající různým párům primerů (pouze vrchní řetězec):

A1 AATTGTCGAC _____ GCGTGT (554 bp)

první čtvrtina

A2 GTCGAC _____ GCGTG TAGCT (554 bp)

první čtvrtina

Hybridizace

- 35 40 µl každé z výše popsaných reakčních směsí polymerázové řetězové reakce se purifikuje za použití kolony chromaspin 400 (Clonetech, Palo Alto, Kalifornie), podle pokynů výrobce. K reakční směsi se před nanesením na kolonu přidá 5 µg DNA jako nosiče. (To se provádí ve většině případů klonování. U některých reakcí se však reakční směs polymerázové řetězové reakce extrahuje směsí fenolu a chloroformu za použití standardních postupů (Sambrook a kol.), pro odstranění Taq polymerázy a DNA vyrobená pomocí polymerázové řetězové reakce se izoluje z vodné fáze za použití standardního postupu srážení ethanolem). DNA používaná jako nosiče se s fragmenty vytvořenými pomocí polymerázové řetězové reakce nevymývá. Reakční protějšky A1 a A2 pro každou čtvrtinu se smíchají, zahřívají ve vařící vodní lázni po dobu 10 minut a poté inkubují přes noc při teplotě 65 °C. Reakční směsi se poté vyjmou z lázně teplé 65 °C a vysráží ethanolem s 1 µl (20 µg) glykogenu prostého nukleázy (Tracy, Prep. Biochem.
- 45 11: 251 – 268 (1981)) jako nosiče. Peleta se převede zpět do suspenze v 40 µl deionizované vody.

Fosforylační reakce:

Fosforylační reakce se provádí následovně:

- 5 40 µl DNA,
- 2,5 µl 20mM ATP,
- 0,5 µl 10X BS/DTT (1X = 5 mM dithiothreitolu (DTT),
- 10 0,5 mg / ml N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA))
- 1,0 µl 10X pufru pro polynukleotid-kinázu (1X = 7mM Tris.HCl, pH 7,6, 0,1 M chloridu
- draselného, 10 mM chloridu hořečnatého)
- 15 2,0 µl polynukleotid-kinázy (New England Biolabs, 20 jednotek).

Inkubace se provádí po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C.

- 20 Reakční směs se poté extrahuje jedenkrát směsí fenolu a chloroformu v poměru 1 : 1, pak
- jedenkrát chloroformem a vodná fáze se vysráží ethanolem za použití standardních postupů.
- Peleta se opět převede do suspenze v 10 µl TE.

Restrikční štěpení

- 25 Směs tvoří:

- 20 µg vektoru Bluescript (BSSK+, Stratagene, La Jolla, Kalifornie),
- 30 10 µl 10X restrikčního pufru (1X = 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM chloridu hořečnatého,
- 100 mM chloridu sodného),
- 5 µl Eco RI (New England Biolabs), 100 jednotek,
- 35 5 µl Hind III (New England Biolabs), 100 jednotek.

Konečný objem reakční směsi činí 100 µl.

Inkubace probíhá po dobu 3 hodin při 37 °C.

- 40 Po dokončení se reakční směs extrahuje stejným objemem fenolu nasyceného TE (10 mM
- Tris.HCl, pH 8,0 a 10 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové). Po centrifugaci se vodná fáze
- extrahuje stejným objemem směsi (nasycené TE) fenolu a chloroformu v poměru 1 : 1 (termín
- 45 „chloroform“ označuje směs chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 24 : 1), a nakonec se
- vodná fáze vzniklá po této extrakci extrahuje stejným objemem chloroformu. Výsledná vodná
- fáze se vysráží ethanolem (přidá se 10 µl 3M octanu sodného a 250 µl absolutního ethanolu, směs
- se nechá stát při teplotě 4 °C po dobu 10 minut a centrifuguje se v mikrocentrifuze při maximální
- rychlosti po dobu 10 minut). Peleta se promyje v 70 % ethanolu, vysuší při teplotě místnosti po
- dobu 5 až 10 minut a převede opět do suspenze ve 100 µl 10mM Tris-HCl (pH 8,3).

50

Fosfatázová reakce

Vektorová DNA se běžně ošetřuje fosfatázou kvůli snížení počtu kolonií získaných bez inzertu. Typicky se používá alkalická fosfatáza ze střeva telat (Sambrook a kol.), mohou však být použity i jiné fosfatázové enzymy.

Typická fosfatázová reakce se připraví, jak je popsáno níže:

90 μ l výše popsané rozštěpené DNA,

10 μ l 10X pufru pro alkalickou fosfatázu ze střeva telat (1X = 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 10 mM chloridu hořečnatého, 1 mM chloridu zinečnatého, 10 mM spermidinu),

1 μ l (1 jednotka) alkalické fosfatázy ze střeva telat (CIP, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana).

Inkubace se provádí při 37 °C po dobu 1 hodiny.

DNA se poté gelově purifikuje (na 1% agarózovém gelu s nízkou teplotou gelování (LGT)) a peleta se opět převede do suspenze v 50 μ l TE. Po elektroforéze se příslušný pás vyřízne z gelu pomocí žiletky, rozpustí při teplotě 65 °C působící po dobu 5 minut a naředí TE v poměru 1 : 1. Tento roztok se extrahuje dvakrát fenolem, jednou výše uvedenou směsí fenolu a chloroformu, a jednou chloroformem. Výsledná vodná fáze se vysráží ethanolem a opět převede do suspenze v TE-pufru.

Ligace:

Pro ligaci fragmentů syntetického genu do vektorů se typicky používají následující podmínky.

5 μ l fosforylovaného inzertu DNA,

2 μ l fosfatázovaného vektoru Bluescript rozštěpeného Eci RI a Hind III, zahřátého na 65 °C a poté ochlazeného,

1 μ l 10X ligačního pufru (1X pufr = 30 mM Tris.HCl (pH 7,8), 10 mM chloridu hořečnatého, 10 mM dithiothreitolu, 1 mM ATP),

1 μ l N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA) (1 mg / ml),

1 μ l ligázy (3 jednotky, Promega, Madison, Wisconsin).

Reakční směs pro ligace se typicky inkubuje při teplotě 16 °C přes noc nebo při teplotě místnosti po dobu 2 hodin.

Transformace:

Transformace ligovaných fragmentů DNA do Escherichia coli se provede za použití standardních postupů (Sambrook a kol.), jak je popsáno výše.

Identifikace rekombinantů

Vyberou se bílé nebo světle modré kolonie vzniklé inkubací transformačních desek přes noc. Plazmidy v transformantech se charakterizují za použití standardních postupů miniscreeningu

(Sambrook a kol.), nebo jak je popsáno výše. Typicky se používá jeden ze tří postupů, uvedených níže:

- 5 (1) minipreparační postup varu DNA,
 - (2) miniscreening za použití polymerázové řetězové reakce,
 - (3) minipreparace octanem amonným.
- 10 Restrikční štěpení rekombinantních plazmidů, o kterých se má za to, že obsahují první čtvrtinu, se provede následovně:

(a) štěpení Bam HI a Aat II:

- 15 10 µl DNA + 10 µl 1X pufru New England Biolabs restriction enzyme Buffer 4,
- 0,5 µl Bam HI (10 jednotek),
- 0,5 µl Aat II (5 jednotek).

20 Inkubace se provádí po dobu 2 hodin při 37 °C.

Klony, u kterých se identifikuje, že vykazují požadovaný typ restrikce, se poté rozštěpí v oddělených reakcích Pvu II a Bgl II. Pouze u klonů, které vykazují požadovaný typ restrikce při štěpení všemi třemi enzymy, se dále provádí sekvenování.

Sekvenování klonovaných fragmentů genů:

30 Sekvenování se provádí za použití modifikace Sangerovy metody využívající dideoxyribonukleotidů jako terminátorů reakce (Sambrook a kol.) za použití dvouřetězcová DNA se soupravou Sequenase 2 kit (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio). Celkem se sekvenuje šest klonů první čtvrtiny. Ze sekvenovaných klonů se pouze u dvou klonů, označených pQA1 a pQA5 zjistí, že obsahují pouze po jedné delecii. Každá z těchto delecí představuje jeden pár bází, umístěný u pQA1 v poloze 452 a u pQA5 v poloze 297.

35 Plazmid pQA1 se použije s pP1-8 (jak je popsáno níže) pro získání první čtvrtiny se očekávanou sekvencí.

40 Příklad 2B

Syntéza a klonování druhé čtvrtiny (páry bází 531 až 1050)

Matrice: oligomery U8 – U14 a L8 – L14

45 Primery pro polymerázovou řetězovou reakci:

Přímé:

P3 (a) : 5'-GCTGCGCGAC GTCAGCGTGT TCGG-3'

P3 (b) : 5'-AATTGCTGCG CGACGTCAGC GTG-3'

Obrácené:

P4 (a) : 5'-GGCGTTGCCC ATGGTGCCGT ACAGG-3'

P4 (b) : 5'-AGCTGGCGT TGCCCATGGT GCCG-3'

Pár primerů B1: P3(b) + P4(a)

5 Pár primerů B2: P3(a) + P4(b).

Produkty polymerázové řetězové reakce:

B1 AATTGCTGCG _____ AACGCC (524 bp)
druhá čtvrtina

B2 GCTGCG _____ AACGCCAGCT (524 bp)

10 Hybridizace, amplifikace pomocí polymerázové řetězové reakce, velikostní frakcionace na centrifugační koloně (spin column) a klonování tohoto fragmentu genu do vektoru Bluescript rozštěpeného Eco RI a Hind III se provede jako je popsáno výše pro první čtvrtinu (příklad 2A). Produkt polymerázové řetězové reakce pro tuto čtvrtinu má velikost přibližně 529 bp, a představuje druhou čtvrtinu genu (nukleotidy 531 až 1050). Transformace se provádí do zmrazených kompetentních buněk Escherichia coli (DH5alfa) za použití standardních postupů
15 popsaných výše (Sambrook a kol.).

Miniscreening klonů pQB:

20 Minipreparovaná DNA se připraví jak je popsáno výše a rozštěpí se (a) Aat II a Nco I, (b) Pvu II a (c) Bgl I, pro potvrzení struktury inzertu ve vektoru před sekvenováním.

Sekvenování se provádí jak je popsáno výše za použití Sangerovy metody využívající dideoxyribonukleotidů jako terminátorů reakce (Sambrook a kol.).

25 Pro tuto čtvrtinu se sekvenuje celkem třináct klonů. Druhá čtvrtina vždy obsahuje jednu nebo několik delecí mezi polohami 884 až 887. Ve většině případů je deletován G v poloze 884.

30 Plazmid pQB5 má pouze jednu delecí v poloze 884. Tato oblast leží mezi dvěma místy Sac II (polohy 859 a 949). Oprava této delece je popsána v příkladu 3.

Klony první poloviny (1 – 1050 bp)

35 Fragment pro klonování první poloviny (čtvrtiny 1 a 2) syntetického genu Bt kukuřice jako jediný fragment se získá restrikčním štěpením produktu polymerázové řetězové reakce obsahujícího první čtvrtinu a druhou čtvrtinu. Pro štěpení DNA (následující extrakci fenolem a vysrážení ethanolom) se použije restrikční endonukleáza AatII, reakční směs má objem 20 µl. 15 µl obou čtvrtin rozštěpených Aat II se smíchá a liguje (v objemu 50 µl pomocí přidání 5 µl 10X ligučního pufru (1X = 30 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM chloridu hořečnatého, 10 mM dithiothreitolu, 1 mM ATP), 14 µl deionizované vody a 1 µl T4 DNA-ligázy (3 jednotky, Promega, Madison, Wisconsin)) při teplotě místnosti po dobu 2 hodin. Výsledkem je fragment o velikosti přibližně 1
40 kb, jak se stanoví elektroforézou na 1% agarózovém gelu probíhající za standardních podmínek (Sambrook a kol.). 10 µl produktu ligace se amplifikuje pomocí polymerázové řetězové reakce za podmínek popsaných dříve s tím rozdílem, že se nechá proběhnout pouze pět cyklů.

Pár primerů: HA = P1(a) + P4(b)

Pár primerů: HB = P1(b) + P4(a).

5

Produkt těchto reakcí se klonuje do vektoru Bluescript (Stratagene, La Jolla, Kalifornie), jak je popsáno pro jednotlivé čtvrtiny. Tento postup se provede pouze jednou, tj. všechna inzertovaná DNA se získá v konkrétní oblasti z jediné polymerázové řetězové reakce.

10

Provede se miniscreening třiceti šesti kolonií pomocí štěpení Sal I a Pvu II. Všechny kromě čtyř obsahují inzert o velikosti přibližně 1 kb, a z nich alespoň 20 vykazuje správný typ štěpení Pvu II. Osm z těchto klonů se vybere pro analýzu sekvence. Jeden z klonů, P1-8, má mezi místem Eco NI (396 bp) a Dra III (640 bp) požadovanou sekvenci. Tento klon se použije pro získání plazmidu s požadovanou sekvencí až k místu Dra III (640 bp) v druhé čtvrtině s pQA1

15

(první čtvrtina s delecí v poloze 452 bp, popsáno výše).

Příklad 2C

20

Klonování a syntéza třetí čtvrtiny (páry bází 1021 až 1500)

Matrice: oligomery U15 – U20 a L15 – L21

Primery pro polymerázovou řetězovou reakci:

25

Přímé:

P5 (a) : 5' -TTCCCCCTGT ACGGCACCAT GGGCAACGCC GC-3'

P5 (b) : 5' -AATTGTACGG CACCATGGGC AAC-3'

Obrácené:

P6 (a) : 5' -GAAGCCGGGG CCCTTCACCA CGCTGG-3'

P6 (b) : 5' -AGCTGAAGCC GGGGCCCTTC ACC-3'

30

Pár primerů C1: P5(b) + P6(a)

Pár primerů C2: P5(a) + P6(b).

Produkty polymerázové řetězové reakce:

C1 AATTGTACGG _____ GGCTTC (475 bp)
třetí čtvrtina

C2 TTCCCCCTGTACGG _____ GGCTTCAGCT (484 bp)
třetí čtvrtina

35

Polymerázové řetězové reakce, izolace fragmentu DNA o správné velikosti na centrifugační koloně (spin column), a ligace do vektorů se provede jak je popsáno výše (příklad 2A) za použití vektoru Bluescript rozštěpeného Eco RI a Hind III. Produkt polymerázové řetězové reakce

o velikosti přibližně 479 párů bází představuje třetí čtvrtinu syntetického genu (nukleotidy 1021 až 1500).

- 5 Transformace do zmražených kompetentních buněk *Escherichia coli* kmen DH5alfa, selekce a identifikace transformantů, charakterizace transformantů pomocí miniscreeningu, a sekvenování fragmentu syntetického genu ve vektoru se provede, jak je popsáno výše.

Miniscreening klonů pQC:

- 10 Miniscreening třetí čtvrtiny se provede za použití standardního postupu (Sambrook a kol.). Minipreparovaná DNA se rozštěpí (a) *Nco* I a *Apa* I a (b) *Pvu* II. Klony, které vykazují správný typ restriční štěpení, se sekvenují za použití standardních postupů. Celkově se sekvenuje 22 klonů třetí čtvrtiny. Tři hlavní „horká místa“ delecí ve třetí čtvrtině se identifikují (a) v poloze 1083, (b) mezi polohami 1290 – 1397) a (c) mezi polohami 1356 – 1362. Ve všech
15 klonech s výjimkou jednoho, pQC8, dochází též vždy k inzerci C v poloze 1365. Kromě těchto mutací obsahují klony třetí čtvrtiny řadu dalších zjevně náhodných delecí. Společnou vlastností třech „horkých míst“ mutací ve třetí čtvrtině a tohoto místa v druhé čtvrtině je, že tyto oblasti jsou lemovány na obou stranách sekvencemi, které obsahují přibližně 80 % C + G. Ostatní oblasti, které obsahují 5 až 9 C a G v řadě nejsou ovlivněny. Oligomery U15, U16, U18, U19,
20 L15, L16, L18 a L19 se přetvoří tak, aby se snížil obsah C + G v těchto oblastech. Pět klonů z každé polymerázové řetězové reakce za použití modifikovaných oligomerů se sekvenuje.

- Plazmid pQCN103 má správnou sekvenci třetí čtvrtiny, pouze se změnou v poloze 1326. Tato změna, kterou je substituce G za C, má za následek substituci jedné aminokyseliny (leucinu) za
25 původní (fenylalanin).

Příklad 2D

- 30 Syntéza a klonování čtvrté čtvrtiny (páry bází 1480 až 1960)

- Čtvrtá čtvrtina genu se získá z klonu, který je původně vytvořen aby obsahoval třetí a čtvrtou čtvrtinu genu. „Druhá polovina“ syntetického genu se získá pomocí polymerázových řetězových reakcí, pro fúzování třetí a čtvrté čtvrtiny. Tyto reakce se provádějí s primery pro polymerázovou
35 řetězovou reakci P5 (a) a P6(a) popsanými výše pro třetí čtvrtinu a primery P7(a) a P8(a) (popsanými níže). Obrácený primer je modifikován tak, aby obsahoval místo *Sac* I a terminační kodon. Pro každou čtvrtinu se provedou oddělené reakce se 30 cykly, za použití výše popsaných podmínek. Dvě uvedené čtvrtiny se navzájem spojí pomocí překrývající polymerázové řetězové reakce (overlapping PCR) a následně rozštěpí restričními enzymy *Nco* I a *Sac* I. Výsledný
40 fragment o velikosti 953 bp se klonuje přímo do pCIB3054, který se předtím rozštěpí *Nco* I a *Sac* I a ošetří alkalickou fosfatázou.

- pCIB3054 se zkonstruuje inzercí intronu č. 9 z fosfoenolpyruvát-karboxylázy (PEPC *ivs* č.9) do jedinečného místa *Hpa* I pCIB426 (podrobně popsáno v příkladu 4). pCIB246 se rozštěpí pomocí
45 *Hpa* I a fosfatázuje CIP za použití standardních postupů popsaných v příkladu 2A. PEPC *ivs* č.9 se získá pomocí polymerázové řetězové reakce za použití pPEP-10 jako matrice. pPEP-10 je genomický subklon, který obsahuje celý gen fosfoenolpyruvát-karboxylázy kukuřice kódující C₄-fotosyntetický enzym, plus přibližně 2,2 kb 5'-lemovací a 1,8 kb 3'-lemovací DNA. DNA o délce 10 kb se liguje do místa *Hind*III v pUC18. (Hudspeth a kol., *Plant Molecular Biology*, 12:
50 576 – 589 (1989)). Primým primerem pro polymerázovou řetězovou reakci používanou k získání PEPC *ivs* č.9 je GTACAAAACAGCAACTC a obráceným primerem je CTGCACAAA-GTGGAGTAGT. Produktem polymerázové řetězové reakce je fragment o velikosti 108 bp, který obsahuje pouze sekvence intronu č. 9 fosfoenolpyruvát-karboxylázy. Reakční směs z polymerázové řetězové reakce se extrahuje fenolem a chloroformem, vysráží ethanolem, fosforyluje
55 polynukleotid-kinázou a ošetří T4 polymerázou k zaplnění přidaných bází na 3'-konci nepřito-

mných v matrici, které se nacházejí v produktech polymerázové řetězové reakce (Clark, J. M., Nucleic Acid Research, 16: 9677 – 9686 (1988)), za použití standardních postupů. Kinazovaný fragment se tupými konci klonuje do místa HpaI v pCIB246, za použití dříve popsaných standardních postupů.

5

Amplifikace a sestavení čtvrté čtvrtiny

Matrice: U21 – U26 a L22 – L28

10

Primery pro polymerázovou řetězovou reakci

Přímý:

P7 (a) 5' -TGGTGAAGGG CCCCGGCTTC ACCGG-3'

Obrácený:

15

P8 (a) 5' -ATCATCGATG AGCTCCTACA CCTGATCGAT GTGGTA-3'

Pár primerů 4: P7(a) + P8(a)

Pár primerů 3: P5(a) + P6(a)

20

Pár primerů pro overlapping PCR: P7(a) + P8(a)

Produkt polymerázové řetězové reakce:

čtvrtá čtvrtina: GGTGAA_____ATCAGGCGCTCATCGATGAT
(484 bp)

třetí čtvrtina: TTCCCCCTGTA-----TTCACCGG (484 bp)

druhá čtvrtina: GGTGAA-----CATGATGAT (953 bp)

25

Miniscreeningem plazmidů se identifikují čtyři pozitivní klony a následně se sekvenují za použití standardních postupů.

30

Plazmid Bt.P2 #1 obsahuje přibližně správnou sekvenci čtvrté čtvrtiny, pouze se dvěma mutacemi. Tyto mutace jsou v poloze 1523 (substituce A za G, která má za následek změnu aminokyselin, kdy se substituuje histidin za arginin) a v poloze 1634 (substituce T za C, která má za následek substituci aminokyseliny serinu za threonin).

35

Plazmid Bt.P2 #1 se použije pro konstrukci pCIB4414 popsanou níže. (Chyby se nakonec opravi hybridizací všech oligomerů čtvrté čtvrtiny, rozštěpením Apa I a Bst E II a nahrazením této oblasti v pCIB4414. Ve finálním konstruktu tudíž zůstanou z Bt.P#1 pouze sekvence od polohy 1842 – 1960).

Příklad 3

Sestavení a oprava finálního syntetického genu

5

Syntetický gen Bt cryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici je vytvořen tak, aby se klonoval ve čtvrtinách. Použití polymerázové řetězové reakce má však za následek mutace, kterými jsou ve většině případů delece způsobující mutace čtecího rámce. Plazmidy obsahující jednotlivé čtvrtiny se tudíž sekvenují a správné části se za použití standardních postupů navzájem ligují.

10

Po získání klonů první a druhé čtvrtiny téměř s požadovanou sekvencí se zkonstruují plazmidy pEB1Q#4 a pEB1Q#5 pro získání požadované sekvence syntetického genu Bt až do místa Dra III v poloze páru bází 634 (tato mutace ničí místo Dra III). Konstrukty pEB1Q se vytvoří ligací fragmentu Eco NI / Bam HI o velikosti 3,9 kb z pP1-8 s fragmentem o velikosti 400 bp z pQ1. pEB1Q#5 má požadovanou sekvenci až k místu Dra III, ale pEB1Q#4 má mutaci v poloze páru bází 378.

15

20

Pro opravu místa Dra III v pEB1Q#4 a pEB1Q#5 se zkonstruují plazmidy p1H1M4 a p1H1M5. Plazmidy p1H1M#4 a #5 se vytvoří ligací fragmentu Nco I / Aat II o velikosti 3,5 kb z pEB1Q#4 respektive #5 s fragmentem Nco I / Aat II o velikosti 500 bp z pQB5. Plazmid p1H1M5 obsahuje mutaci mezi místy Sac II v poloze 884 v druhé čtvrtině syntetického genu Bt. Plazmid p1H1M4 obsahuje další mutaci, jak je popsána u jeho výchozího konstrukt pEB1Q#4.

25

30

Místo Sac II v oblasti vektoru Bluescript p1H1M4 se deletuje rozštěpením p1H1M4 pomocí Not I a Sac I a přeměnou těchto míst na tupé konce za použití T4 DNA-polymerázy za standardních podmínek před ligací tohoto fragmentu o velikosti 3,9 kb, kterou se vytvoří p1H1M4^ΔS. Delece místa Sac II ve vektorové oblasti umožňuje odstranění fragmentu Sac II o velikosti 90 bp s mutací v poloze 884 v druhé čtvrtině p1H1M4^ΔS, před nahrazením fragmentem Sac II o velikosti 90 bp. Před rozštěpením Sac II a izolací fragmentu o velikosti 90 bp na 2% Nusieve-gelu se oligomery U / L 12 a 13 kinazují a hybridizují (popsáno výše). Fragment Sac II se liguje do vektoru p1H1M4^ΔS rozštěpeného Sac II o velikosti přibližně 3,8 kb, který byl fosfatázován pomocí CIP. Opravený konstrukt Sac II se nazývá pHYB2#6. Orientace fragmentu Sac II v pHYB2#6 se detekuje screeningem za použití polymerázové řetězové reakce, jak je popsáno dříve, za použití následujících primerů:

MK23A28 = 5'-GGGGCTGCGGATGCTGCCCT-3'

MK25A28 = 5'-GAGCTGACCCTGACCGTGCT-3'

MK26A28 = 5'-CACCTGATGGACATCCTGAA-3'

35

40

Provedením polymerázové řetězové reakce s 50 pmoly primerů MK23A28 a MK25A28 se vytvoří fragment o velikosti přibližně 180 bp, což svědčí o tom, že inzertovaný fragment vázaný místy Sac II v pHYB2#6 je ve správné orientaci. Použití primerů MK25A28 a MK26A28 při screeningu pomocí polymerázové řetězové reakce se používá jako negativní kontrola, kdy se vytvoří fragment o velikosti přibližně 180 bp pouze u konstruktů obsahujících fragment vázaný Sac II ve špatné orientaci. Sekvence pHYB2#6 se stanoví za použití standardních postupů.

45

pHYB2#6 obsahuje jednu mutaci v poloze 378, která se musí opravit, aby se získala první čtvrtina obsahující požadovanou sekvenci.

Plazmid p1HG#6 obsahuje požadovanou sekvenci pro celou první polovinu syntetického genu Bt p1HG#6 a vytvoří se z fragmentu Aat II / Nco I o velikosti 3,4 kb z p1H1M5#2 ligací s fragmentem Aat II / Nco I o velikosti 500 bp z pHYB2#6.

- 5 Pro identifikaci klonů nebo částečných klonů syntetického genu, které obsahují otevřené čtecí rámce, se použije kanamycinový selekční vektor (popsaný výše). Čtvrtá čtvrtina syntetického genu Bt se do kanamycinové kazety umístí jako první. pKM74-4 obsahuje fragment Apa I / Cla I o velikosti přibližně 500 bp z plazmidu BtP2 (který se předtím transformuje do dam- *Escherichia coli* kmenu (PO-100), aby jej bylo možné štěpit Cla I), ligovaný s pUC:KM74 rozštěpeným
10 Apa I a Cla I. Plazmid pKM74-4 vykazuje rezistenci vůči kanamycinu, ale později se zjistí, že obsahuje dvě substituční mutace v poloze 1523 a 1634 (mutace jsou popsány výše v části popisující klonování čtvrté čtvrtiny, jedná se o substituce, nikoli delece či inserce).

- 15 Správná první polovina syntetického genu Bt z plazmidu p1HG#6 se vloží do plazmidu pKM74-4. Výsledný plazmid, nazvaný pKm124 se vytvoří z fragmentu Apa I / Bam HI o velikosti přibližně 3,9 kb, který se získá z pKM74-4, ligovaného s fragmentem Apa I / Bam HI o velikosti 1 kb z p1HG#6. pKm124 vykazuje rezistenci vůči kanamycinu. Tento plazmid obsahuje první, druhou a čtvrtou čtvrtinu syntetického genu vytvářející jediný otevřený čtecí rámec.

- 20 Do pKm124 se poté klonuje třetí čtvrtina syntetického genu. První funkční klon, v plazmidu pBt:Km#6, je funkční kopií zkráceného syntetického genu cryIA(b) v Km-kazetě, která vykazuje rezistenci vůči kanamycinu, ale obsahuje deleční mutace mezi třetí a čtvrtou čtvrtinou. Plazmid pBt:Km#6 se vytvoří z fragmentu Apa I / Nco I o velikosti přibližně 5 kb z vektoru pKM124
25 ligací s fragmentem Apa I / Nco I o velikosti přibližně 500 bp z pQCN103 (pQCN103 obsahuje mutaci (chybné párování nukleotidů, mismatch mutation) v poloze 1326, která se opraví později). Zdá se, že kontaminující nukleázová aktivita delemovala v pBt:Km#6 místo Apa I mezi třetí a čtvrtou čtvrtinou. Protein Bt kódovaný syntetickým genem v plazmidu pBt:Km#6 vykazuje ve srovnání s nativním proteinem přibližně 50 až 60% aktivitu proti *Ostrinia nubilalis*. Fragment
30 Sma I / Bam HI o velikosti 2 kb z pBt:Km#6 se vloží do expresivní kazety 35S, čímž se vytvoří plazmid nazvaný 35S:Bt6.

- Nejprve se získají dva funkční syntetické klony Bt, každý s mutacemi: plazmidy pBT:KM#6 a pCIB4414. pCIB4414, který je v biologických testech na hmyzu ve srovnání s nativním genem
35 100% aktivní vůči *Ostrinia nubilalis* obsahuje substituční mutace ve třetí a čtvrté čtvrtině v polohách 1323, 1523 a 1634.

- pCIB4414 se zkonstruuje ze dvou plazmidů, MG3.G4#18 a 1HG, který je popsán výše. MG3.G4#18 se získá pomocí klonování fragmentu Apa I / Kpn I z plazmidu Bt.P2#1 do pQCN103 (za použití stejných restrikčních míst). Tím se vytvoří plazmid obsahující třetí a čtvrtou čtvrtinu genu. První polovina syntetického genu se vyštěpí z plazmidu 1HG pomocí Bam HI a Nco I a přesune do MG3.G4#18 (obsahujícího třetí a čtvrtou čtvrtinu genu). Výsledný plazmid, pCIB4414, obsahuje funkční verzi syntetického genu. Ačkoli je funkční, obsahuje syntetický gen v tomto plazmidu tři chyby, v poloze 1326 (G substituován za C), v poloze 1523
45 (substituce A za G), a v poloze 1634 (substituce T za C).

- Čtvrtá čtvrtina v pCIB4414 se nahradí fragmentem Apa I / Bst E II čtvrté čtvrtiny o velikosti 354 bp získaným pomocí hybridizace, ligace a restrikčního štěpení oligomerů čtvrté čtvrtiny, jak je popsáno dříve, a izolací fragmentu na 2% Nusieve-agarózovém gelu. pCIB4408 je klonem
50 syntetického genu Bt získaným pomocí nahrazení fragmentu čtvrté čtvrtiny v pCIB4414 hybridizovaným fragmentem čtvrté čtvrtiny. Pro inserci promotoru CaMV 35S před syntetický gen Bt se pCIB4408 vytvoří z fragmentu Eco NI / Kpn I o velikosti 4 kb z plazmidu p35SBt6 a fragmentu Eco NI / Kpn I o velikosti 1,8 kb z pCIB4408.

pCIB4406 je (při srovnání s proteinem z nativního genu) 100% aktivní proti *Ostrinia nubilalis*, ale obsahuje substituční mutaci ve třetí čtvrtině syntetického genu v poloze 1323, která má za následek náhradu aminokyseliny leucinu za fenylalanin. Pro opravu této mutace se použije plazmid pBS123#13.

5

Fragment třetí čtvrtiny v plazmidu pBS123#13 se vytvoří z fragmentu o velikosti přibližně 479 bp vyrobené hybridizací oligomeru. Oligomery třetí čtvrtiny U15 – U20 a L15 – L21 se kinázují, hybridizují, a ligují jak je popsáno výše. Polymerázové řetězové reakce se provádějí jak je popsáno výše s primery p5(a) a P6(b) při 15 cyklech. Produkt polymerázové řetězové reakce se ošetří proteinázou K v konečné koncentraci zhruba 50 µg / ml v objemu přibližně 95 µl po dobu 30 minut při 37 °C a následně po dobu 10 minut při 65 °C (Crowe a kol., *Nucleic Acid Research* 19: 184, 1991). Následně se produkt extrahuje fenolem a chloroformem a vysráží ethanolem za použití standardních postupů, načež se rozštěpí restričními enzymy Apa I a Nco I.

10

Fragment Apa I / Nco I o velikosti přibližně 450 bp z polymerázové řetězové reakce se liguje s vektorovým fragmentem Apa I / Nco I o velikosti 3,8 kb z p1HG#6, čímž se vytvoří pBS123#13. Plazmid pBS123#13 obsahuje požadovanou sekvenci pro třetí čtvrtinu genu cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici od polohy 1319 v místě Nsp I přes místo Apa I v poloze 1493. Tento fragment Nsp I / Apa I o velikosti 170 bp z pBS123#13 se použije v plně aktivním syntetickém genu cryIA(b) v plazmidu pCIB4418.

20

Analýza pomocí western blottingu:

Analýzy různých transformantů pomocí western blottingu (westernového přenosu) se provádí a použití surových extraktů získaných z *Escherichia coli* pěstovaných na selektivních deskách. Za použití párátka se kultury, které se nechaly růst přes noc při teplotě 37 °C, odeberou z čerstvých desek obsahujících zajímavé transformanty. Pozitivní kontrolou pro expresi genu Bt v *Escherichia coli* je konstrukt nazvaný pCIB3069, který obsahuje nativní gen Bt-k fúzovaný s promotorem CaMV 35S exprimovatelným v rostlinách. pCIB3069 též obsahuje promotor 35S operabilně spojený s genem rezistence vůči hygromycinu, promotor 35S s intronem Adh č.1 operabilně spojený s genem GUS a promotor 35S operabilně spojený s genem kódujícím produkci nativního insekticidního proteinu Bt cryIA(b). V analýzách je též zahrnuta negativní kontrola, kterou je *Escherichia coli*, která neobsahuje gen Bt. Kultury se převedou do suspenze ve 100 µl nanášecího pufru (loading buffer) obsahujícího 62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 % dodecyl-sulfátu sodného (SDS), 0,0025 % bromfenolové modři, 10 % glycerolu a 7,5 % merkaptio-ethanolu. Po zahřátí směsi na 95 °C na dobu 10 minut se směs sonikuje po dobu 1 až 3 sekund. Zbytky se centrifugují na mikrocentrifúze při teplotě místnosti po dobu přibližně 5 minut a 10 až 15 µl každého vzorku se nanese na akrylamidový gel s 10% gelem (running gel) pod 6% gelem (stacking gel) (Laemmli, *Nature* 227, 680 – 685 (1970)). Po elektroforéze přes noc při 10 mA se proteiny přenesou z gelu na membránu Immobilon (Millipore). Transfer se provede za použití jednotky pro elektroforetický přenos electrophoretic Blotting Unit (American Bio-Nuclear, Emeryville, Kalifornie) v transferovém pufru (20 mM Tris, 150 mM glycinu a 20 % methanolu) po dobu 1,5 hodiny při 450 mA.

25

30

35

40

Mezi pufr pro western blotting patří:

45

blokující pufr (blocking buffer):

50

2 % povrchově aktivního činidla Tween-20,
30 mM Tris-HCl, pH 10,2,
150 mM chloridu sodného,

promývací pufr (wash buffer):

- 0,05 povrchově aktivního činidla Tween-20,
- 30 mM Tris-HCl, pH 10,2,
- 150 mM chloridu sodného,

vyvíjecí pufr (developing buffer):

- 100 mM Tris-HCl, pH 9,6,
- 100 mM chloridu sodného,
- 10 mM chloridu hořečnatého

- Po dokončení transferu se membrána inkubuje po dobu přibližně 10 minut v blokujícím pufru. Před ošetřením první protilátkou se provede promytí promývacím pufrem třikrát po 15 minutách. První protilátkou je imunoafinitně purifikovaná králičí nebo kozí protilátka připravená za použití proteinu CryIA(b) jako antigenu (Ciba-Geigy, RTP, Severní Karolina, Rockland Inc., Gilbertsville, Pensylvanie, a Berkeley Antibody CO., Richmond, Kalifornie). Protilátka specifická proti cryIA(b) se ošetří bezprostředně před použitím lyzátem *Escherichia coli* z Bio-Rad v objemu 1 ml s 5 µg protilátky a 50 µl lyzátu *Escherichia coli* v promývacím pufru. Tato směs se inkubuje po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti, poté se naředí 1 ku 30 a pak na konečné zředění 1 : 6000 promývacím pufrem. Inkubace membrány s první protilátkou probíhá při teplotě místnosti po dobu 1,5 hodiny.

- Mezi ošetřením první a druhou protilátkou se provede promytí třikrát po 10 minutách. Druhou protilátkou je buďto králičí proti-kozí, nebo kozí proti-králičí konjugát s alkalickou fosfatázou (Sigma, St. Louis, Montana). Inkubace s konjugátem alkalické fosfatázy se provádí při teplotě místnosti po dobu jedné hodiny za použití zředění promývacím pufrem 1 : 6000. Mezi ošetřením druhou protilátkou a vyvíjením western blottingu se provede promytí šestkrát po 10 minutách. Western blotting se vyvíjí ve 100 ml vyvíjecího pufru s 440 µl nitroblue-tetrazolium v 70% dimethylformamidu (75 mg / ml) a 330 µl 5-brom-4-chlorindolyl-fosfátu v 100% dimethylformamidu (50 mg / ml). Po vyvíjení po dobu 15 až 30 minut se membrána promyje ve vodě a vysuší vzduchem.

35 Příklad 4

Konstrukce transformačních vektorů

Konstrukce pCIB710 a derivátů:

- Plazmidy pCIB709 a pCIB710 obsahující kazetu promotoru CaMV 35S se zkonstruují jak uvádějí Rothstein a kol., Gene 53: 153 – 161 (1987). pCIB710 obsahuje promotor CaMV a sekvence terminace transkripce pro RNA-transkript 35S (Covey a kol., Nucl. Acids. Res., 9: 6735 – 6747 (1981)). Fragment DNA CaMV vzniklý restrikcí BglII o velikosti 1149 (bp 6494 – 7643 v Hohn a kol., Current Topics in Microbiology and Immunology, 96: 194 – 220 a přílohy A až G (1982)) se izoluje z DNA CaMV pomocí preparativní elektroforézy v agaróзовém gelu, jak je popsáno dříve. Fragment se smíchá s DNA plazmidu pUC19 rozštěpeného BamHI, ošetří T4 DNA-ligázou, a transformuje do *Escherichia coli*. (Je třeba si uvědomit, že restrikční místo BamHI ve výsledném plazmidu se zničí ligací lepivých konců BglII s lepivými konci BamHI.)

- Výsledný plazmid, nazvaný pUC19/35S se poté použije pro oligonukleotidově řízenou mutagenézi in vitro pro inzerci rozpoznávací sekvence pro BamHI GGATCC bezprostředně za nukleotid CaMV 7483 (podle práce Hohn a kol., viz výše). Výsledný plazmid, pCIB710, obsahuje promotorovou oblast CaMV 35S a oblast terminace transkripce oddělenou restrikčním

místem BamHI. Sekvence DNA inzertované do tohoto místa BamHI se v rostlinách exprimují pomocí sekvencí regulujících transkripci CaMV. (Též je třeba si povšimnout, že pCIB710 neobsahuje žádné kodony iniciace translace ATG mezi počátkem transkripce a místem BamHI).

- 5 pCIB710 se modifikuje inzercí fragmentu Bam HI obsahujícího kódující sekvenci pro hygromycin-fosfotransferázu z pLG90 (Rothstein a kol., Gene, 53: 153 – 161 (1987)) do místa Bam HI, čímž se vytvoří pCIB709.

- 10 pCIB709 se modifikuje pro vytvoření pCIB996 tak, že se odstraní ATG bezprostředně upstream od iniciačního kodonu genu hygromycin-fosfotransferázy a použití standardních technik mutagenese, a do této polohy se inzertuje restriční místo Bgl II. Výsledný plazmid, pCIB996 se dále modifikuje tak, že se odstraní místa Bam HI, Sma I a Bgl II v 5'-nepřekládané vedoucí oblasti umístěné směrem k 5'-konci od iniciačního kodonu pro iniciační kodon. Výsledkem je změna sekvence bází DNA z –TATAAGGATC CCGGGGGCA AGATCTGAGA TATG–Hyg
15 na –TATAAGGATC TGAGATATG–Hyg. Výsledný plazmid se označí pCIB3073.

- Alternativně se pCIB710 modifikuje pro vytvoření pCIB900 tak, že se inzertuje do místa Bam HI v pCIB710 fragment Bam HI – Bcl I z pCIB10/35SBt, který obsahuje kódující sekvenci Bt pro 645 aminokyselin, popsanou níže v části C4, čímž se vytvoří pCIB710/35SBt. Pro zavedení
20 markeru rezistence vůči antibiotiku se pCIB709 rozštěpí Sal I, liguje se adaptor Kpn I / Sal I a výsledný produkt ligace se rozštěpí Kpn I. Fragment Kpn I z pCIB709, který obsahuje 35S / gen rezistence vůči hygromycinu se inzertuje do místa Kpn I v pCIB710/35SBt, čímž se vytvoří pCIB900.

- 25 Mezi geny, které lze použít jako selektabilní markery, patří gen rezistence vůči hygromycinu, který popsali Rothstein a kol., Gene 53: 153 – 161 (1987). Gen rezistence vůči hygromycinu popsaný v tomto odkazu se přenesení do plazmidu pUC jako je pCIB710 nebo pCIB709 a ATG obsažený „navíc“ upstream od sekvence kódující hygromycin-fosfotransferázu se odstraní, čímž se vytvoří pCIB996. Tento modifikovaný gen pCIB996 se dále modifikuje tak, že se odstraní
30 místa BglII, BamHI a SamI z 5'-koncové oblasti genu za použití standardních postupů molekulární biologie, čímž se vytvoří pCIB3073.

- pCIB932 je plazmid na bázi pUC19, který obsahuje chimérický gen Pep-C: promotor / Bt / Pep-C: terminátor. Je složen z fragmentů získaných z pPEP-10, HindIII-subklonu genomového
35 klonu, H1-lambda-14 PNAS USA, 83: 2884 – 2888 (1986), z kukuřičného genu kódujícího enzym fosfoenol-pyruvát-karboxylázu aktivní ve fotosyntéze, a z pCIB930, což je fragment BamHI obsahující zkrácenou formu endotoxinového genu cryIAb o velikosti 645 aminokyselin v místě BamHI v pUC18.

- 40 Fragment EcoRI – XhoI o velikosti 2,6 kb z pPEP-10, obsahující polyadenylační místo z genu fosfoenolpyruvát-karboxylázy, se izoluje a rozštěpí Pst I a HincII. Štěp vzniklý restričním štěpením se liguje s pUC18 rozštěpeným PstI a HincII, transformuje do Escherichia coli a mezi transformanty se vyhledávají ty, které obsahují inzert PstI – HincII o velikosti 412 bp v pUC18, a inzert se ověří sekvenováním. Výsledný plazmid se nazývá pCIB931.

- 45 Jaderný gen kódující izoenzym fosfoenolpyruvát-karboxylázy („Pep-C“) popsali Hudspeth a kol., Plant Molecular Biology, 12: 579 – 589 (1989). pCIBV932 se zkonstruuje ligací tří fragmentů. První fragment, obsahující terminátor transkripce fosfoenolpyruvát-karboxylázy se získá pomocí štěpení pCIB931 úplně HindIII a částečně SphI a izolace fragmentu o velikosti 3098 bp.
50 Druhý fragment, obsahující kódující sekvenci endotoxinu Bt se získá pomocí rozštěpení pCIB930 NcoI a SphI a izolace fragmentu o velikosti 1950 bp. Třetí fragment, obsahující promotor fosfoenolpyruvát-karboxylázy se získá pomocí štěpení pPEP-10 úplně HindIII, částečně Nco I a izolace fragmentu o velikosti 2,3 kb. Ligační směs se transformuje do Escherichia coli, transformanty se správným inzertem se identifikují, a inzert se ověří sekvenováním.

55

pCIB932 se rozštěpí PvuII, čímž se vytvoří fragment o velikosti 4,9 kb obsahující kukuřičný gen Pep-C: promotor / Bt / Pep-C: terminátor, který se purifikuje na 1% agarózovém gelu (s agarózou s nízkou teplotou gelování) v 1X TAE. Linearizovaný vektor pCIB3079 a inzert o velikosti 4,9 kb z pCIB932 se ligují za použití T4 DNA-ligázy v agaróze s nízkou teplotou gelování, čímž se vytvoří pCIB4401. pCIB4401 je transformační vektor pro kukuřici, který obsahuje chimérické geny 35S: promotor / PAT / 35S: terminátor, Pep-C: promotor / Bt / Pep-C: terminátor, a 35S: promotor / AdhI intron č. 1 / Gus / 35S: terminátor.

Konstrukce pCIB246 (35S – GUS – 35S):

Kazeta s promotorem CaMV 35S, pCIB246, se zkonstruuje následovně.

Restrikční místo DdeI v nukleotidové poloze 7482 genomu CaMV (Franck a kol., Cell, 21: 285 – 294 (1980)) se modifikuje inzercí oligonukleotidu o velikosti 48 bp, který obsahuje několik rozpoznávacích míst pro restrikční enzymy, včetně místa NcoI (CCATGG), místa Sall (GTCGAC) a místa SstI (GAGCTC). Tento změněný promotor CaMV 35S se inzertuje do vektoru pUC19, který se předtím modifikuje tak, že se zničí místa SstI a Sall vektoru. Promotor CaMV 35S v pCIB1500 tedy obsahuje jedinečná místa SstI a Sall pro klonování.

pCIB1500 se rozštěpí SstI a NcoI a liguje s genem GUS (glukuronidázy) získaným z pBI221 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, Kalifornie). Místo NcoI se fúzuje s genem GUS tak, že ATG v místě NcoI působí jako startovací kodon pro translaci genu GUS. Pro 3'-konec chimérického genu se použijí polyadenylační signál a terminační signál z CaMV 35S.

Konstrukce pCIB3069 (35S – AdhI – GUS – 35S):

pCIB246 se modifikuje tak, že se do místa Sal I v pCIB246 přidá intron č. 1 genu alkohol-dehydrogenázy AdhI kukuřice (AdhI) (Dennis a kol., Nucleic Acids Research, 12: 3983 – 4000 (1984)), čímž se vytvoří plazmid pCIB3007. Intron AdhI se vyštepí z genu AdhI kukuřice jako fragment Bal I / Pst I a subklonuje se do pUC18 rozštěpeného SamI a Pst I, čímž se vytvoří plazmid nazvaný Adh 1026. Adh 1026 se rozštěpí Pvu II a Sac II, konce fragmentů se otupí T4 DNA-polymerázou, za použití standardních postupů se přidají linkery Sal I, fragment o velikosti přibližně 560 bp se izoluje z 3% NuSieve-gelu a liguje do pUC18 rozštěpeného Sal I a ošetřeného fosfatázou. Adh intron č. 1 navázaný Sal I ve výsledném plazmidu se vyštepí Sal I, purifikuje v gelu, a liguje do pCIB246 rozštěpeného Sal I a ošetřeného fosfatázou, čímž se získá plazmid pCIB3007.

pCIB3007 se rozštěpí PstI a konce se otupí za použití T4 DNA-polymerázy (New England Biolabs) podle pokynů dodavatele. Výsledné molekuly s tupými konci se rozštěpí SphI a fragment o velikosti přibližně 5,8 kb s jedním tupým koncem a druhým koncem Sph I se purifikuje na agarózovém gelu s nízkou teplotou gelování za použití standardních postupů. pCIB900 se rozštěpí Sma I a Sph I a fragment obsahující gen 35S / Bt se purifikuje na agarózovém gelu s nízkou teplotou gelování. Tyto dva gelově purifikované fragmenty se ligují v agaróze s nízkou teplotou gelování za použití T4 DNA-ligázy za standardních podmínek. Výsledné ligované fragmenty se transformují do Escherichia coli za použití standardních postupů a výsledný plazmid se nazve pCIB3062. Existují dvě verze pCIB3062. pCIB3062#1 má regenerované místo Sma I v místě ligace místa Sma I a konců otupených T4 polymerázou, což je pravděpodobně následkem toho, že T4 polymeráza odštěpila během reakce sloužící k otupení konců několik párů bází z místa Pst I. pCIB3062#3 toto místo SmaI neobsahuje.

pCIB3062#3 se rozštěpí KpnI, konce se otupí za použití T4 DNA-polymerázy a následně se provede štěpení Pvu II, čímž se získá fragment o velikosti 6,4 kb s tupými konci obsahující geny 35S / GUS a 35S / Bt. Tento fragment s tupými konci se liguje do pCIB3073 rozštěpeného Sma I, čímž se vytvoří pCIB3063 nebo pCIB3069. pCIB3069 obsahuje stejný fragment jako se použije pro vytvoření pCIB3036, ale chimérické geny jsou v pCIB3069 na rozdíl od pCIB3063 všechny

ve stejné relativní orientaci. Tyto plazmidy obsahují a) promotor 35S operabilně spojený s genem rezistence vůči hygromycinu, b) promotor 35S, s Adh intronem č.1, operabilně spojený s genem GUS, a c) promotor 35S operabilně spojený s genem kódujícím produkci syntetického insekticidního proteinu cryIA(b) z *Bacillus thuringiensis*, jak je popsán výše.

5

GUS-testy:

GUS-testy se provádějí v podstatě jak popsal Jefferson, Plant Mol. Bio. Reporter, 5: 387 – 405 (1987). Jak je uvedeno výše, obsahuje plazmid pCIB246 promotor CaMV 35S fúzovaný s genem GUS. 5'-nepřekládaná vedoucí oblast tohoto chimérického genu obsahuje kopii Adh1 intronu č. 1 kukuřice. Používá se zde jako transformační kontrola. Ačkoli se ke každé transformaci přidává stejné množství pCIB246, vypočítaná aktivita mezi testovanými konstrukty Bt se liší. Hodnoty uvedené níže tvoří průměr ze tří opakování. pCIB4407 se testuje dvakrát.

15 pCIB 3069 28 nM MU/μg/min,

pCIB4407 0,7 nM MU/μg/min, 2,3 nM MU/μg/min.

20 Příklad 5A

Test insekticidní aktivity syntetického genu cryIA(b) proti *Ostrinia nubilalis*

25 U syntetického genu cryIA(b) v pCIB4414 v *Escherichia coli* se testuje jeho insekticidní aktivita proti *Ostrinia nubilalis* podle následujícího postupu.

30 Tekutá umělá potrava pro hmyz se nalije do petriho misky (Gellman) o průměru 60 mm. Po jejím ztuhnutí se na povrch nanese v koncentraci 3×10^7 buněk/cm² buňky *Escherichia coli* suspendované v 0,1% preparátu Triton X-100. Desky se vysuší vzduchem. Na povrch potravy se poté umístí deset larev prvního instaru zavíječe kukuřičného, *Ostrinia nubilalis*, starých méně než 12 hodin. Test se inkubuje při 30 °C v úplné tmě po dobu 2 až 5 dnů. Na konci testu se stanoví procento mortality. Za pozitivní klon se považuje takový klon, který způsobuje mortalitu 50 % nebo vyšší, přičemž kontrolní buňky *Escherichia coli* způsobují mortalitu 0 až 10 % jako pozadí.

35 Pro srovnání se ve stejné koncentraci testu je nativní gen cryIA(b) v pCIB3069. Klony se testují v koncentraci 3×10^7 buněk / cm² potravy, používá se 20 jedinců hmyzu na klon.

Zjistí se následující výsledky:

Klon	Procento mortality
kontrola	0
pCIB3069	100
pCIB4414	100

40

Uvedené výsledky svědčí o tom, že insekticidní krystalický protein produkovaný syntetickým genem cryIA(b) vykazuje aktivitu proti *Ostrinia nubilalis* srovnatelnou s insekticidním proteinem produkovaným nativním cryIA(b). Ostatní plazmidy obsahující syntetický gen cryIA(b) se testují podobným způsobem.

45

Příklad 5B

Test insekticidní aktivity proteinu cryIA(b) proti *Diatraea saccharalis*

- 5 CryIA(b) se exprimuje v *Escherichia coli* a testuje se jeho insekticidní aktivita proti *Diatraea saccharalis* podle stejného postupu jako pro *Ostrinia nubilalis*, který je popsán bezprostředně výše. Výsledky jsou shrnuty v tabulce.

10 Tabulka

Test proteinu Bt z *Escherichia coli* s *Diatraea saccharalis*

Koncentrace proteinu (ng / g)	Procento mortality CryIA(b)
10	0
25	0
50	7
100	13
250	40
500	53
1000	80
LC50	380
95% CI	249 – 646

- 15 Výsledky svědčí o tom, že insekticidní protein produkovaný genem Bt optimalizovaným pro kukuřici je účinný proti *Diatraea saccharalis*. Výše uvedených koncentrací proteinu CryIA(b), 250 ng / g – 1000 ng / g, lze dosáhnout v transgenických rostlinách kukuřice vytvořených podle vynálezu.

20

Příklad 6

Izolace protoplastů kukuřice a transformace syntetickým genem Bt

- 25 Expres syntetického genu Bt se testuje v dočasně transformovaných protoplastech kukuřice.

Postup izolace protoplastů:

- 30 1. Obsah deseti suspenzních kultur kukuřičné 2717 linie 6 starých dva dny se pipetuje do sterilních zkumavek o objemu 50 ml a nechá se usadit. Kultivační médium se poté zcela odstraní.
2. Buňky (3 až 5 ml objemu (Packed Cell Volume)) se převedou do suspenze v 30 ml protoplastového enzymového roztoku následujícího složení:

- 35 3 % cellulasy RS,
1 % macerozymu R10 v KMC–pufru.

KMC–pufr (předpis na 1 litr):

- 40 chlorid draselný 8,65 g
hexahydrát chloridu hořečnatého 16,47 g
dihydrát chloridu vápenatého 12,50 g
morfolinethansulfonová kyselina 5,0 g
pH 5,6, sterilizováno filtrací

3. Buňky se důkladně promíchají a vzorky o objemu přibližně 15 ml na misku se nanesou do petriho misek o rozměrech 100 x 25 mm. Misky se třepou na třepačce s rotačním výkyvem po dobu 4 hodin, aby došlo ke štěpení.

5

4. Na každé používané síto o velikosti otvorů 100 μ m se pipetuje 10 ml KMC a přes síto se zfiltruje obsah misek. Síto se promyje stejným objemem KMC.

10

5. Protoplasty přefiltrované přes síto se pipetují opatrně do kyvet o objemu 50 ml a centrifugují na centrifúze Beckman TJ-6 po dobu 10 minut při 1000 otáčkách za minutu (500 g).

6. Supernatant se odstraní a peleta se opatrně převede do suspenze v 10 ml KMC. Obsah tří kyvet se smíchá a objem se upraví KMC na 50 ml.

15

7. Centrifugace a promytí se opakuje podle výše uvedených kroků.

8. Všechny promyté protoplasty se převedou do suspenze v 50 ml KMC a spočítají se v hemocytometru. Protoplasty se centrifugují a opět převedou do suspenze v koncentraci 8×10^6 / ml v suspendovacím pufru (RS-pufu).

20

RS-pufr (předpis na 500 ml):

	mannitol	27,33 g
	chlorid vápenatý (0,1M zásobní roztok)	75 ml
25	morfolinethansulfonová kyselina	0,5 g
	pH 5,8, sterilizováno filtrací.	

Postup transformace protoplastů:

30 1. 50 μ g plazmidové DNA (konstruktů insekticidních proteinů Bt, jak syntetického (pCIB4407), tak nativního (pCIB3069)) se vloží do polystyrénových kultivačních zkumavek o objemu 15 ml. Do všech zkumavek se též přidá 25 μ g plazmidové DNA obsahující GUS (která neobsahuje insekticidní protein Bt (pCIB246). Pro každý testovaný konstrukt se provádějí tři opakování, s jedním opakováním neobsahujícím žádnou DNA jako kontrolou.

35

konstrukty Bt: konstrukty GUS:

pCIB3069 pCIB246
pCIB4407

40

2. Protoplasty se opatrně, ale dobře promíchají a přidá se jich 0,5 ml do každé zkumavky.

3. Do každé zkumavky se přidá 0,5 ml PEG-40.

45

PEG-40:

0,4 M mannitolu,
0,1 M tetrahydrátu dusičnanu vápenatého,
pH 8,0, sterilizováno filtrací.

50

4. Obsah se opatrně promíchá, aby se protoplasty smíchaly s PEG a počká se 30 minut.

5. Postupně se přidá v intervalech 5 minut 1 ml, 2 ml a 5 ml roztoku W5.

Roztok W5

- 5 154 mM chloridu sodného,
125 mM hydrátu chloridu vápenatého,
5 mM chloridu draselného,
5 mM glukózy,
pH 7,0 sterilizováno filtrací.

10

6. Proveďte se centrifugace po dobu 10 minut v centrifuze Beckman TJ-6 při přibližně 1000 otáčkách za minutu (500 g) a supernatant se odstraní.

- 15 7. Peleta se opatrně převede do suspenze v 1,5 ml FW-média a suspenze se nanese opatrně do petriho misek o rozměrech 35 x 10 mm.

FW-médium (předpis pro 1 litr):

MS-soli	4,3 g
200X B5 vit.	5 ml
sacharóza	30 g
prolin	1,5 g
mannitol	54 g
2,4 D (2,4-dichlorfenoxycetová kyselina)	3 mg
pH 5,7, sterilizováno filtrací.	

- 20 8. Směs se inkubuje přes noc ve tmě při teplotě místnosti.

9. Provedou se GUS-testy, biologické testy na hmyzu a ELISA-testy protoplastových extraktů, jak je popsáno níže.

25

Příklad 7

Konstrukce syntetického genu cryIA(b) optimalizovaného pro kukuřici o plné délce

- 30 Sekvence 4 znázorňuje syntetickou sekvenci optimalizovanou pro kukuřici, která kóduje insekticidní protein cryIA(b) o plné délce z *Bacillus thuringiensis*. Zkrácená verze, která je popsána výše, představuje prvních přibližně 2 kb tohoto genu. Zbytek genu o plné délce se klonuje za použití výše popsaných postupů. Ve stručnosti, do tohoto postupu patří syntéza DNA-oligomerů o délce 40 až 90 nukleotidů, typicky za použití 80-merů jako průměrné velikosti.
- 35 Oligomery se purifikují za použití standardních postupů kapalinové chromatografie s vysokou rozlišovací schopností (HPLC) nebo izolace z polyakrylamidového gelu. Purifikované oligomery se kinasují a hybridizují, čímž se vytvoří fragmenty o velikosti přibližně 500 bp. Hybridizované oligomery lze amplifikovat za použití polymerázové řetězové reakce za standardních podmínek. Fragmenty o velikosti 500 bp, buďto přímo získané hybridizací, amplifikací pomocí
- 40 polymerázové řetězové reakce, či izolované z agarózových gelů po hybridizaci nebo amplifikaci pomocí polymerázové řetězové reakce se poté klonují do plazmidu a transformují do *Escherichia coli* za použití standardních postupů.

- 45 Rekombinantní plazmidy obsahující požadované inzerty se identifikují, jak je popsáno výše, za použití polymerázové řetězové reakce nebo/a standardního miniscreeningu. Inzerty, které na základě analýzy pomocí polymerázové řetězové reakce nebo/a pomocí restričních enzymů vypadají jako správné, se sekvenují, aby se identifikovaly klon obsahující požadovaný otevřený čtecí rámec. Fragmenty se poté ligují se syntetickou sekvencí o velikosti přibližně 2 kb popsanou

v příkladu 2, čímž se vytvoří syntetický gen cryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici o plné délce, vhodný pro expresi vysokých množství proteinu CryIA(b) v kukuřici.

Obsah G + C v nativních a syntetických genech Bt:

5

nativní gen o plné délce	38,8 %
zkrácený nativní gen	37,2 %
syntetický gen o plné délce	64,8 %
zkrácený syntetický gen	64,6 %.

10

Procento homologie finální zkrácené verze genu Bt při porovnání s genem obsahujícím pouze kodony preferované kukuřicí činí 98,25 %.

15 Příklad 8

Konstrukce hybridního genu cryIA(b) částečně optimalizovaného pro kukuřici o plné délce exprimovatelného v rostlině

- 20 pCIB4434 obsahuje gen CryIA(b) o plné délce tvořený syntetickým genem cryIA(b) optimalizovaným pro kukuřici o velikosti přibližně 2 kb se zbytkem genu (část kódující C-konec) získaným z nativního genu. Kódující oblastí je tedy chimérický gen tvořený syntetickým genem a nativním genem, ale výsledný protein je identický s nativním proteinem cryIA(b). Syntetická oblast je tvořena nukleotidy 1 – 1938 (aminokyseliny 1 až 646) a nativní
- 25 kódující sekvence je tvořena nukleotidy 1939 až 3468 (aminokyseliny 647 až 1155). Sekvence tohoto genu je uvedena na obrázku 7. Mapa pCIB4434 je znázorněna na obrázku 8.

Pro vytvoření pCIB4434 byly zkonstruovány následující oligomery:

KE134A28 = 5'-CGTGACCGAC TACCACATCG ATCAAGTATC CAATTTAGTT

30

GAGT-3'

KE135A28 = 5'-ACTCAACTAA ATTGGATACT TGATCGATGT GGTAGTCGGTC

ACG-3'

KE136A28 = 5'-GCAGATCTGA GCTCTTAGGT ACCCAATAGC GTAACGT-3'

KE137A28 = 5'-GCTGATTATG CATCAGCCTAT-3'

KE138A28 = 5'-GCAGATCTGA GCTCTTATTC CTCCATAAGA AGTAATTC-3'

MK05A28 = 5'-CAAAGGTACC CAATAGCGTA ACG-3'

MK35A28 = 5'-AACGAGGTGT ACATCGACCG-3'

- pCIB4434 se vytvoří ligací čtyř částí z fragmentu z pCIB4418 o velikosti 5,7 kb, fragmentu Bst E II / Kpn I z fúze syntetického a nativního genu vytvořené pomocí polymerázové řetězové reakce o velikosti 346 bp, fragmentu Kpn I / Nsi I nativního cryIA(b) z pCIB1315 o velikosti 108 bp a fragmentu Nsi I / Bgl II vytvořeného pomocí polymerázové řetězové reakce o velikosti 224 bp. Standardní podmínky pro ligaci a transformaci jsou popsány dříve.

- Fragment fúze syntetického a nativního genu se vytvoří ve dvou krocích za použití polymerázové řetězové reakce. Prvních 253 bp fúzního fragmentu vytvořeného pomocí polymerázové řetězové reakce se připraví za použití 100 pmol oligomerů KE134A28 a MK04A28 s přibližně 200 ng nativní matrice cryIA(b) v objemu 100 µl s 200 nm každého z deoxyribonukleotidtrifosfátů, 1X PCR-pufrem (Perkin Elmer Cetus), 20% glycerolem a 5 jednotkami Taq polymerázy (Perkin Elmer Cetus). Parametry prováděné polymerázové řetězové reakce jsou následující: 1 minuta při 94 °C, 1 minuta při 55 °C, 45 sekund při 72 °C, s prodloužením třetího kroku o 3 sekundy, počet cyklů je 25. Část (1 %) produktu této první polymerázové řetězové reakce se použije jako matrice spolu s 200 ng syntetické DNA cryIA(b) pro vytvoření kompletního fragmentu fúze syntetického a nativního genu o velikosti 351 bp. Oligomery použité jako primery pro polymerázovou řetězovou reakci v této druhé polymerázové řetězové reakci jsou MK34A28 (50 pmol), MK04A28 (50 pmol) a KE135A28 (25 pmol). Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci a parametry této reakce jsou stejné, jako je uvedeno výše. Výsledný fragment fúze syntetického a nativního genu o velikosti 351 bp se ošetří proteinázou K v celkové koncentraci 50 µg / ml, extrahuje fenolem a chloroformem a následně se vysráží ethanolem před rozštěpením Bst E II a Kpn I za standardních podmínek.

- Fragment Nsi I / Bgl II vytvořený pomocí polymerázové řetězové reakce o velikosti 224 bp použitý pro konstrukci pCIB4434 se vytvoří za použití 100 pmolů oligomerů KE137A28 a KE138A28 a 200 ng nativního genu cryIA(b) jako matrice v objemu 100 µl, přičemž jsou reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci a parametry této reakce stejné, jako je uvedeno výše. Fragment nativního cryIA(b) vytvořený pomocí polymerázové řetězové reakce o velikosti 230 bp se ošetří proteinázou K, extrahuje fenolem a chloroformem a před rozštěpením Bst E II a Kpn I se vysráží ethanolem, jak je popsáno výše.

- pCIB4434 se transformuje do protoplastů kukuřice, jak je popsáno výše. Protoplasty linie 6 2717 se použijí s pCIB4434 a pCIB4419 jako kontroly pro srovnání. Výsledky jsou uvedeny níže:

	ng Bt / mg proteinu
4419 (35S)	14 400 ± 2100
4434 (o plné délce)	2200 ± 900

pozadí = 13 ng Bt / mg proteinu pro netransformované protoplasty

- Výsledky svědčí o tom, že se pCIB4434 exprimuje při porovnání s pCIB4419 v množství odpovídajícím přibližně 15 %.

- Analýza pomocí western blottingu dokazuje, že alespoň jedna třetina proteinu cryIA(b) vytvořeného v tomto systému za použití pCIB4434 má velikost přibližně 130 kD. V buňkách kukuřice se tedy pomocí exprese pCIB4434 vytváří významné množství proteinu cryIA(b) o plné délce.

Příklad 7

Konstrukce genů cryIA(b) o plné délce kódujících teplotně stabilní protein cryIA(b)

- 5 Konstrukty pCIB5511 – 5515, z nichž každý obsahuje gen cryIA(b) o plné délce, jsou popsány níže. V těchto sekvencích se opraví mezi aminokyselinami 793 a 794 delece 26 aminokyselin, KCGEPNRCAPHLEWNPDLDCSCRDGE, které jsou přítomny v cryIA(a) a cryIA(c), ale ne v cryIA(b). Gen v pCIB5513 je syntetický, zbylé čtyři geny jsou hybridní, a jsou tedy částečně optimalizované pro kukuřici.

10

Konstrukce pCIB5511:

- Tento plazmid je derivátem pCIB4434. Mapa pCIB5511 je znázorněna na obrázku 10. Segment DNA o velikosti 435 bp mezi nukleotidy 2165 a 2590 se zkonstruuje hybridizací syntetických oligomerů vytvořených tak, že představují horní a dolní řetězec, jak je popsáno výše pro konstrukci zkráceného genu cryIA(b). Tento segment syntetické DNA se syntetizuje za použití standardních postupů známých v oboru a zahrnuje 26 aminokyselin, která jsou přirozeně deletována v proteinu cryIA(b) z *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD-1. Celý inzertovaný segment DNA používá ke kódování aminokyselin kodony preferované kukuřicí. V tomto fragmentu je obsaženo 26 aminokyselin použitých pro opravu přirozeně se vyskytující delece. Inzertují se do pCIB4434 počínaje polohou 2387 mezi místo Kpn I (nukleotid 2170) a místo XbaI (nukleotid 2508, v pCIB5511 2586). pCIB5511 se zkonstruuje pomocí ligace tří částí za použití fragmentu o velikosti 3,2 kb získaného restričním štěpením pCIB4434 sphI a KpnI, fragmentu o velikosti 3,8 kb získaného štěpením pCIB4434 SphI a XbaI, a fragmentu o velikosti 416 bp získaného štěpením syntetické DNA popsané výše KpnI a XbaI. Enzymatické reakce se provádějí za standardních podmínek. Po ligaci se směs DNA transformuje do kompetentních buněk *Escherichia coli* za použití standardních postupů. Transformanty se selektují na L-agaru obsahujícím ampicillin v množství 100 µg / ml. Plazmidy v transformantech se charakterizují za použití standardního miniscreeningu. Sekvence opraveného genu cryIA(b) kódujícího teplotně (tepelně) stabilní protein cryIA(b) je znázorněna na obrázku 9.

30

Konstrukce pCIB5512:

- Tento plazmid je derivátem pCIB4434. Mapa pCIB5512 je znázorněna na obrázku 12. DNA pro opravu delece 26 aminokyselin se připraví za použití standardních technik syntézy DNA a enzymatických reakcí. Připraví se tři kazety dvouřetězcové DNA, pGFcas1, pGFcas2 a pGFcas3, z nichž každá má velikost přibližně 300 bp. Kazety se vytvoří tak, aby obsahovaly kodony optimalizované pro kukuřici, při zachování 100% aminokyselinové identity s insekticidním proteinem. Tyto kazety se použijí k nahrazení oblasti mezi restričními místy BstEII v poloze 1824 a XbaI v poloze 2508 a obsahují inzerci dalších 78 bp, které kódují chybějících 26 aminokyselin (popsány výše pro pCIB5511 a pCIB4434). Každá z těchto kazet se klonuje do místa EcoRV vektoru Bluescript (Stratagene) pomocí standardních postupů. Uvedené tři kazety jsou vytvořeny tak, že obsahují překrývající se restriční místa. Kazeta 1 má na 5'-konci restriční místo BstEII a na 3'-konci EcoRV, kazeta 2 má na 5'-konci místo EcoRV a na 3'-konci ClaI a kazeta 3 má na 5'-konci místo ClaI a na 3'-konci Xba I. Klonují se jednotlivě do vektoru Bluescript a kompletní fragment o velikosti 762 bp se následně sestaví ligací za použití standardních postupů. pCIB5512 se sestaví za použití tohoto fragmentu o velikosti 762 bp jeho ligací s fragmentem o velikosti 6,65 kb získaným úplným štěpením pCIB4434 BstEII a částečným štěpením XbaI. Alternativně se může použít ligace čtyř částí používající stejný vektor a tři kazety rozštěpené specifickými enzymy. Enzymatické reakce se provádí za standardních podmínek. Po ligaci se směs DNA transformuje do kompetentních buněk *Escherichia coli* za použití standardních postupů. Selektce transformantů se provádí na L-agaru obsahujícím ampicillin v množství 100 µg / ml. Plazmidy v transformantech se charakterizují za použití standardního miniscreeningu. Výsledný plazmid je pCIB5512. Sekvence opraveného genu cryIA(b) je uvedena na obrázku 11. Tento opravený cryIA(b) se liší od genu obsaženého

55

v pCIB5511 tím, že je za použití kodonů preferovaných kukuřicí optimalizována pro expresi v kukuřici větší část kódující oblasti cryIA(b).

Konstrukce pCIB5513:

5

Tento plazmid obsahuje opravený gen cryIA(b) získaný z pCIB5512. Mapa pCIB5513 je znázorněna na obrázku 14. Oblast směrem k 3'-konci od místa XbaI v poloze 2586 do konce genu (místo BglII v poloze 3572) se zcela zamění kodony optimalizovanými pro kukuřici. Tato oblast se syntetizuje za použití standardních technik syntézy DNA a enzymatických reakcí, známých v oboru, ve formě čtyř kazet dvouřetězcové DNA (kazety č. 4, 5, 6, 7). Sousedící kazety mají překrývající se restriční místa pro usnadnění spojení kazet. Jedná se o místa XbaI a XhoI na 5'-konci respektive 3'-konci kazety 4, XhoI a SacI na 5'-konci respektive 3'-konci kazety 5, SacI a BstXI na 5'-konci respektive 3'-konci kazety 6 a BstXI a BglII na 5'-konci respektive 3'-konci kazety 7. Jak je popsáno v případě pCIB5512, kazety se klonují do místa EcoRV s otupenými konci vektoru Bluescript (Stratagene) a „opravený“ gen cryIA(b) o plné délce se klonuje buď postupným sestavením výše uvedených kazet ve vektoru Bluescript následovaným ligací kompletní syntetické oblasti o velikosti 967 bp s fragmentem o velikosti 6448 bp získaným úplným štěpením pCIB5512 BglII a částečným štěpením XbaI. Alternativně se plazmid obsahující geny o plné délce získá ligací pěti částí každé ze čtyř kazet (po štěpení příslušnými enzymy) a stejného vektoru, jako je uvedeno výše. Sekvence „opraveného“ genu cryIA(b) o plné délce je znázorněna na obrázku 13. Různé chimérické kódující oblasti, syntetické a skládající se ze syntetické a nativní části, kódují stejný protein. Tento protein je tepelně stabilní verzí cryIA(b) vytvořenou pomocí opravy přirozeně se vyskytující delece 26 aminokyselin nacházející se, při srovnání homologické oblasti s delta-endotoxiny cryIA(a) nebo cryIA(c) z *Bacillus thuringiensis*, v genu cryIA(b) z *Bacillus thuringiensis* kurstaki HD-1.

25

Konstrukce pCIB5514:

Tento plazmid je derivátem pCIB4434. Mapa pCIB5514 je znázorněna na obrázku 16. Vytvoří se za použití kazety syntetické DNA č. 3 (viz výše), která obsahuje sekvenci optimalizovanou pro kukuřici oblasti mezi místem ClaI (v poloze 2396) nacházejícím se v termostabilní oblasti 26 aminokyselin a místem XbaI v poloze 2508 v pCIB4434 (v pCIB5511 2586). Oblast mezi nukleotidem 2113 v pCIB4434 a spojením termostabilní oblasti se amplifikuje pomocí polymerázové řetězové reakce za použití pCIB4434 jako matrice s následujícími primery:

35

přímý:

5' GCACCGATATCACCATCCAAGGAGGCGATGACGTATTCAAAG-3'

obrácený:

5' -AGCGCATCGATTCTGGCTCCCCGCACTTGCCGATTGGACTTGGGGCTGAAAG-3'

Produkt polymerázové řetězové reakce se poté rozštěpí restričními enzymy KpnI a ClaI a liguje se reakcí obsahující čtyři části s fragmentem o velikosti 189 bp získaným štěpením kazety 3 ClaI a SbaI, fragmentem o velikosti 3,2 kb z pCIB4434 rozštěpeného SphI a KpnI a fragmentu o velikosti 3,8 kb z pCIB4434 získaného rozštěpením SphI a Xba. Enzymatické reakce se provádějí za standardních podmínek. Produkt ligace se transformuje do kompetentních buněk *Escherichia coli*, selektuje pomocí ampicillinu a provede se screening za použití standardních postupů popsaných výše. Sekvence opraveného genu cryIA(b) obsažená v pCIB5514 je znázorněna na obrázku 15.

45

Konstrukce pCIB5515:

pCIB4434 se modifikuje přidáním výše popsaného Geiserova termostabilního elementu (Geiser TSE) mezi místo Kpn I (v poloze 2170 bp) a místo Xba I (v poloze 2508 bp) v nativní oblasti Btk. Přesně místo inzerce začíná nukleotidem č. 2379. Oblast obsahující Geiser TSE se amplifikuje za použití dvou sad polymerázových řetězových reakcí, tj. polymerázové řetězové reakce fragmentu Kpn I – Geiser TSE a fragmentu Geiser TSE – Xba I.

Primer č. 1 pro polymerázovou řetězovou reakci (místo Kpn I)

10 **5' - ATTACGTTAC GCTATTGGGT ACCTTTGATG - 3'**

Primer č. 2 pro polymerázovou řetězovou reakci (Geiser TSE, spodní část)

**5' - TCCCCGTCCC TGCAGCTGCA GTCTAGGTCC GGGTTCCACT
CCAGGTGCGG AGCGCATCGA TTCGGCTCCC CGCACTTGCC
GATTGGACTT GGGGCTGA - 3'**

Primer č. 3 pro polymerázovou řetězovou reakci (Geiser TSE, vrchní část)

**5' - CAAGTGCGGG GAGCCGAATC GATGCGCTCC GCACCTGGAG
TGAACCCCGG ACCTAGACTG CAGCTGCAGG GACGGGGAAA
AATGTGCCCCA TCATTCCC - 3'**

15 Primer č. 4 pro polymerázovou řetězovou reakci (místo Xba I)

5' - TGGTTTCTCT TCGAGAAATT CTAGATTTC - 3'

Po amplifikaci se fragmenty vzniklé polymerázovou řetězovou reakcí rozštěpí Kpn I a Cla I, respektive Cla I a Xba I. Tyto fragmenty se ligují do pCIB4434 rozštěpeného Kpn I a Xba I. Výsledný konstrukt pCIB5515 je pCIB4434 s Geiser TSE a přidaným místem Cla I lemovaným Kpn I a Xba I. Mapa pCIB5515 je znázorněna na obrázku 38. Zde obsažený gen cryIA(b), který kóduje teplotně stabilní protein cryIA(b), je znázorněn na obrázku 37.

Níže uvedené příklady 9 až 20 se zaměřují na izolaci a charakterizaci dřevně preferovaného promotoru.

25 **Příklad 9**

30 **Izolace RNA a northern blotting**

RNA se izoluje z rostlin pěstovaných ve skleníku. Celková RNA se izoluje jak popsali Kramer a kol., Plant Physiol., 90: 1214 – 1220 (1990) z následujících tkání kukuřičné linie Funk 5N984: ze zelených listů rostlin starých 8, 11, 15, 25, 35, 40 a 60 dní, ze dřevě rostlin starých 8, 11, 15, 25, 35, 39, 46, 60 a 70 dní, z opěrných kořenů rostlin starých 60 a 70 dní kukuřičné linie Funk 5N84 a obalů a větvení rostlin 5N984 starých 60 a 70 dní. RNA se též izoluje z kořenů rostlin 211D starých 14 dní a z vyvíjejících se semen v týdenních intervalech od prvního do pátého týdne po opylení. Poly A⁺ RNA se izoluje za použití oligo-dT jak popsali Sambrook a kol.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (druhé vydání). 1989, a provede se northern blotting, též jak popsali Sambrook a kol., za použití celkové RNA (30 µg) nebo poly A+ RNA (2 – 10 µg). Po elektroforéze se RNA blotuje na membrány Nitroplus 2000 (Micron Separations Inc.). RNA se naváže na filtr za použití Stratalinkeru (Stratagene) při 0,2 mJ. Jako sonda se při northern blottingu použije 8–2 cDNA–fragment EcoRI dřeně (TRpA) o velikosti 1200 bp, izolovaný za použití 0,8% agarózy s nízkou teplotou tání v pufrovacím systému TBE. Provede se hybridizace a promytí a filtry se exponují na film, jak je popsáno v části Izolace cDNA–klonů.

10 Příklad 10

Izolace cDNA–klonů

Syntéza prvního řetězce cDNA se provede za použití systému I reverzní transkriptázy BRL AMV za podmínek specifikovaných dodavatelem (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland). Přesněji se 25 µl reakční směsi obsahující 50 mM Tris–HCl pH 8,3, 20 mM chloridu draselného, 1 mM dithiothreitolu, 6 mM chloridu hořečnatého, 1 mM každého z deoxyribonukleotidtrifosfátů, 0,1 mM oligo (dT) 12 – 18, 2 µg dřeňové poly(A+) RNA, 100 µg / ml N,O–bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA), 50 µg / ml aktinomycinu D, 8 jednotek placentálního inhibitoru RNasy, 1 µl (10 mM Ci / ml) 32P dCTP s více než 3000 mCi / mM jako činidla pro sledování (tracer), a 30 jednotek reverzní transkriptázy AMV inkubuje při 42 °C po dobu 30 minut. Přidá se další chlorid draselný k upravení koncentrace na 50 mM a inkubace pokračuje po dobu dalších 30 minut při 42 °C. Opět se přidá chlorid draselný k dosažení konečné koncentrace 100 mM. Přidá se další reakční pufr pro reverzní transkriptázu AMV, aby se zachovaly výchozí koncentrace ostatních složek, a dalších 10 jednotek, a inkubace pokračuje po dobu dalších 30 minut při 42 °C. Syntéza druhého řetězce se dokončí za použití systému syntézy cDNA Riboclone s Eco RI–linkery (Promega, Madison, Wisconsin). Velikost dvouřetězcové cDNA se zjistí na 1% agarózovém gelu za použití pufru Tris – boritan – kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), jak popsali Sambrook a kol. a zjistí se, že průměrná velikost činí přibližně 1,2 kb. Provede se velikostní frakcionace cDNA za použití membrány NA45 DEAE tak, že se zadrží molekuly o velikosti přibližně 1000 bp nebo větší, za podmínek specifikovaných dodavatelem (Schleicher a Schuell). Velikostně frakcionovaná cDNA se liguje do vektoru Lambda ZapII (Stratagene, La Jolla, Kalifornie) a sbalí do lambda částic za použití Gigapack II Plus (Stratagene, La Jolla, Kalifornie). Neamplifikovaná knihovna má titr 315000 pfu (phage forming units, jednotek tvořících fágy), zatímco amplifikovaná knihovna má titr 3,5 miliardy / ml za použití buněk PLK–F'.

Rekombinantní fágy se nanesou v hustotě 5000 pfu na desky L–agaru o rozměrech 150 x 15 mm. Celkově se provede screening 50000 fágů za dvojitého odběru z každé desky a pomocí sond prvního řetězce cDNA vytvořených buď z mRNA získané ze dřeně, nebo z mRNA získané ze semen. Odběr se provede jak popsali Sambrook a kol. za použití nitrocelulózových filtrů. DNA se upevní na filtry pomocí zesílení UV světlem za použití přístroje Stratalinker (Stratagene, La Jolla, Kalifornie) při 0,2 mJ. Prehybridizace a hybridizace filtru se provádí v roztoku, který tvoří 10X Denhardtova roztoku, 150 µg / ml DNA spermatu lososa (sheared salmon sperm DNA), 1 % dodecylsulfátu sodného (SDS), 50 mM fosforečnanu sodného, pH 7, 5 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové, 6X citrátového pufru s chloridem sodným (SSC), a 0,05 % pyrofosforečnanu sodného. Prehybridizace probíhá po dobu 4 hodin při 62 °C a hybridizace po dobu 18 hodin (přes noc) při 62 °C s 1 milionem cpm (pulzů za minutu) / ml v objemu 40 ml. Filtry se promyjí v 500 ml 2X SSC, 0,5% SDS při teplotě místnosti po dobu 15 minut a poté při teplotě 63 °C v 0,1X SSC, 0,5% SDS po dobu 30 minut pro každé promytí. Radioaktivně značené DNA–sondy se připraví za použití systému značení random primer labeling system (BRL) a nezačleněná radioaktivita se odstraní za použití kolon Nick Columns (Pharmacia). Filtry se exponují přes noc na film citlivý na paprsky X Kodak X–Omat AR za použití (DuPont) Cronex Lightning Plus intensifying screens při teplotě –80 °C. Plaky vykazující hybridizaci se

sondou získanou z dřene a nikoli se sondou získanou ze semene se purifikují pro další charakterizaci.

5 Příklad 11

Izolace genomových klonů

Genomová DNA z inbrední kukuřičné linie Funk 211D se izoluje jak popsali Shure a kol., Cell, 35: 225 – 233 (1988). DNA se částečně rozštěpí Sau 3A a následně se provede velikostní frakcionace za použití gradientů sacharózy 10 až 40 % za centrifugace v rotoru Beckman SW40 při 22000 otáčkách za minutu po dobu 20 hodin při 20 °C. Frakce o velikosti 9 až 23 kb se spojí a vysráží ethanolem. Lambda Dash II (Stratagene) rozštěpený Bam HI se použije podle pokynů dodavatele. Provede se screening neamplifikované knihovny a zkoumá se celkem 300000 pfu za použití výše popsaných podmínek. Jako sonda pro knihovnu se použije dřenově specifický (TrpA) cDNA–klon 8–2, pCIB5600, který se identifikuje pomocí odečítacího screeningu cDNA–knihovny. Izolované klony se purifikují jako plaky a provede se příprava fágů ve velkém rozsahu za použití Lambdasorb (Promega) podle pokynů dodavatele. Izolované genomové klony se rozštěpí Eco RI a fragment EcoRI o velikosti 4,8 kb se subklonuje do vektoru Bluescript (Stratagene).

Příklad 12

25 Sekvence DNA a počítačová analýza

Sekvenování nukleotidů se provede za použití postupu využívajícího dideoxyribonukleotidů jako terminátorů reakce, jak popsali Sanger a kol., PNAS, 74: 5463 – 5467 (1977). Primery pro sekvenování se syntetizují na DNA–syntetizátoru Applied Biosystems model 380B za použití standardních podmínek. Sekvenační reakce se provádí za použití systému Sequenase (US Biochemical Corp.). Gelová analýza se provádí na 6% polyakrylamidových gelech se 7 M močoviny o rozměrech 40 cm v pufr Tris–boritan–kyselina ethylendiamintetraoctová (BRL Gel–Mix 6). Analýza sekvencí a porovnání se sekvencemi v genové bance GenBank se provede za použití softwaru z Univerzity of Wisconsin Genetic Computer Group Sequence Analysis Software (UWGCG).

Příklad 13

40 Mapování místa počátku transkripce

Metoda „primer extension“ se provádí podle postupu, který popsali Metraux a kol., PNAS, 86: 896 – 900 (1988). Ve stručnosti se 30 µg celkové RNA z dřene kukuřice teplotně hybridizuje s primerem v 50mM Tris pH 7,5, 40mM chloridu draselném, 3mM chloridu hořečnatém (RT–pufr) tak, že se provede zahřátí na 80 °C na dobu 10 minut a pomalé ochlazení na 42 °C. Směs RNA a primeru se nechá hybridizovat přes noc. Přidá se další RT–pufr, dithiothreitol na koncentraci 6 mM, N,O–bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) na koncentraci 0,1 mg / ml, RNAsin v množství 4 jednotky (U) / ml a každý z deoxyribonukleotidtrifosfátů v množství 1 mM. Poté se přidá 8 jednotek reverzní transkriptázy a reakční směs se umístí na 1 hodinu do teploty 37 °C. Použitý primer je 5'–CCGTCGTTCTCCTTCGTC GAGG–3', který začíná v místě +90 bp, vztaženo na místo počátku transkripce, viz obrázek 28 A. Za použití stejného primeru jako v reakci „primer extension“ se vytvoří „sekvenační žebřík“, za použití genomového klonu o velikosti 4,8 kb, aby se umožnilo stanovení místa počátku transkripce. Sekvenační reakce se provádí jak je popsáno v příkladu 12.

Pro stanovení, zda je sekvence o velikosti 371 bp od +2 bp do +373 bp (počátek cDNA) souvislá, nebo obsahuje jeden nebo více intronů, se použije metoda chránění proti účinkům RNasy („RNase protection“). Fragment SphI – NcoI o velikosti 385 bp nacházející se od +2 bp do +387 bp, vztaženo k místu počátku transkripce, viz obrázek 28B, se klonuje do pGEM-5Zf(+) (Promega) a transkribuje za použití systému Riboprobe Gemini (Promega) pomocí promotoru SP6, aby se vytvořily radioaktivní antisense RNA-sondy, jak popisuje dodavatel. „RNase protection“ se provádí jak popsali Sambrook a kol. Použitými markery molekulární hmotnosti jsou pBR322 (rozštěpený HpaII a koncově označený pomocí 32P-dCTP) a Klenow fragment. Použijí se gely obsahující 6 % akrylamidu a 7 M močoviny (BRL Gel-Mix 6), a analýza se provádí při stálém příkonu 60 W.

Příklad 14

15 Southern blotting genomové DNA

Genomová DNA se izoluje z kukuřičné linie 211D za použití postupu, který popsali Shure a kol., viz výše. Pro každé štěpení restričních enzymem se použije 8 µg genomové DNA. V pufru doporučeném dodavatelem se použijí následující enzymy: BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII a SacI. Klon číslo 8–2 cDNA dřeně se použije pro odhad počtu kopií genu. Rozštěpená DNA se rozdělí na 0,7% agarózovém gelu za použití pufračního systému Tris-boritan-kyselina ethylen-diamintetraoctová. Gel se před vlastním použitím ošetří 250mM kyselinou chlorovodíkovou po dobu 15 minut, aby se usnadnil přenos DNA o vysoké molekulové hmotnosti. DNA se přenesne na membránu Nitroplus 2000 a následně se analyzuje s dřeňovou cDNA 8–2 jako sondou. Proveďte se promytí jak je popsáno v příkladu 10.

Příklad 15

30 Materiál a metody polymerázové řetězové reakce

Polymerázové řetězové reakce se provádějí za použití soupravy GeneAmp DNA Amplification reagent kit a rekombinantní Taq DNA-polymerázy AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus). Reakční podmínky jsou následující: pro každou reakci se použije 0,1 až 0,5 µM každého ze dvou primerů, 25 ng fragmentu EcoRI ze dřeně o velikosti 4,8 kb ve vektoru Bluescript, a reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci popsána dodavatelem, celkový objem činí 50 µl v reakční zkumavce GeneAmp o objemu 0,5 ml (Perkin Elmer Cetus). Použije se teplotní cyklovač DNA Therman Cycler (Perkin Elmer Cetus) za použití programu Step-Cycle, denaturace probíhá při 94 °C po dobu 60 sekund, teplotní hybridizace při 55 °C po dobu 60 sekund a extenze při 72 °C po dobu 45 sekund s následným prodloužením o 3 sekundy na cyklus, při celkovém počtu 30 cyklů. Použijí se následující sady primerů, naznačených na obrázku 24: I. 83 X 84, –429 bp až –2 bp, II. 49 X 73, –69 bp až +91 bp, III. 38 X 41, +136 bp až +258 bp, a IV. 40 X 75, +239 bp až +372 bp.

45

Příklad 16

Izolace dřeňově preferovaného genu

cDNA–knihovna získaná z dřeňové mRNA se klonuje do fága Lambda Zap a provede se screening za použití prvního řetězce cDNA získaného z mRNA buďto dřeně, nebo semene. Klony, které hybridizují pouze se sondou z dřeně se plakově purifikují a jejich screening se zopakuje. Klony, které projdou i druhým screeningem se použijí jako sondy při northern blottingu za použití RNA z různých tkání kukuřice.

55

Příklad 17

Struktura genu a analýza sekvence

5

Inzert cDNA–klonu 8–2 o velikosti 1,2 kb se sekvenuje za použití postupu využívajícího dideoxyribonukleotidů jako terminátorů reakce, který popsali Sanger a kol., viz výše. Podobně se sekvenuje genový ekvivalent obsažený v fragmentu EcoRI o velikosti 4,8 kb ve vektoru bluescript označeném jako pCIB5601. Získá se tak informace, že genomová kopie kódující oblasti má velikost 1,7 kb a obsahuje pět intronů. mRNA–transkript obsahuje šest exonů, což je uvedeno na obrázku 24. Velikost exonů činí od 43 bp do 313 bp a velikost intronů je v rozmezí od 76 bp do 130 bp. Celá sekvence genu a jeho odpovídající odvozená aminokyselinová sekvence je znázorněna na obrázku 24.

10

15

Tento gen kóduje protein obsahující 346 aminokyselin o molekulové hmotnosti přibližně 38 kD. Jak je uvedeno v tabulce 1, vykazuje předpokládaný protein podobnost 62 % a identitu 41 % s podjednotkou proteinu z *Pseudomonas aeruginosa* a je vysoce homologický s proteiny trpA z jiných organismů.

20

Tabulka 1

Porovnání sekvencí TrpA mezi genem TrpA kukuřice a jinými organismy

Porovnávaný organismus	% podobnosti aminokyselin	% identity aminokyselin
<i>Haloferax volcanii</i>	56,4	36,1
<i>Methanococcus voltae</i>	58,1	35,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62,5	41,8
<i>Neurospora crassa</i>	61,4	39,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56,7	36,1

25

Legenda k tabulce 1:

Za podobné aminokyseliny se považují: I = L = M = V, D = E, F = Y, K = R, N = Q, S = T.

30

Podobnost a identita se porovná za použití programu GAP z UWGCG.

35

Crawford a kol., Ann. Rev. Microbiol., 43: 567 – 600 (1989) našli v bakteriálních genech TrpA oblasti konzervativních aminokyselin. Jsou jimi aminokyseliny 49 až 58, aminokyseliny 181 až 184, a aminokyseliny 213 až 216, s tím, že zbytek genu vykazuje větší variabilitu než je pozorována u sekvence TrpB. Porovnání známých proteinů trpA s proteinem TrpA kukuřice (není uvedeno) svědčí o tom, že existuje značná homologie mezi genem kukuřice a ostatními proteiny trpA. Tato homologie je též srovnatelná s úrovní homologie zjištěnou při porovnání ostatních proteinů TrpA navzájem, jak popsali Crawford a kol., viz výše.

40

Pro stanovení lokalizace místa počátku transkripce a toho, zda jsou v této oblasti přítomné introny či nikoli, se použijí čtyři fragmenty vytvořené pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) o velikosti 122 bp až 427 bp z oblasti od –429 bp do +372 bp pro analýzu pomocí northern blottingu. Výsledky této analýzy ukazují, že PCR–sondy II, III a IV hybridizují s celkovou RNA dřeně a PCR–sonda I nehybridizuje, což svědčí o tom, že se místo počátku transkripce nachází v oblasti –69 bp až +90 bp. Pro přesnější lokalizaci místa počátku transkripce se použije metoda „primer extension“. Na obrázku 28A je znázorněno, že v případě, že se pro „primer extension“ použije primer (č. 73) umístěný v poloze +90 bp vzhledem k místu počátku transkripce, je místo počátku transkripce umístěno v místě +1, 1726 bp na genomové sekvenci.

45

První kodon ATG od místa počátku transkripce je v poloze +114 bp. Předpokládá se, že tento kodon slouží jako místo iniciace translace. Tento kodon ATG začíná otevřené čtení, které probíhá v otevřeném čtecím rámci nacházejícím se v cDNA–klonu. Prvních 60 aminokyselin tohoto předpokládaného otevřeného čtecího rámce silně připomíná chloroplastový tranzitní peptid, viz Berlyn a kol. PNAS, 86: 4604 – 4608 (1989) a Neumann–Karlin a kol., EMBO J., 5: 9 – 13 (1986). Tento výsledek svědčí o tom, že je zkoumaný protein cílen do plastidu a je pravděpodobně upraven tak, že se získá aktivní protein. Testy dočasné exprese s genem B.t. optimalizovaným pro kukuřici řízeným promotorem trpA za použití protoplastů kukuřičného mesofylu ukazují, že v případě, že se jako místa spojení použije ATG v poloze +114 bp, dosáhne se nejvyšší úrovně exprese. Použití kteréhokoli z dalších dvou kodonů ATG v sekvenci podstatně snižuje úroveň exprese reportérového genu. Při použití ATG v poloze +390 bp se dosáhne určité aktivity, ale na mnohem nižší úrovni než při použití ATG v poloze +114, a při použití ATG v poloze +201 se nezjistí žádná aktivita.

Ačkoli je upstream od místa počátku transkripce v poloze +1 bp umístěna řada boxů podobných TATA–boxu, je rostlinné konvenční sekvenci TATAAA nejpodobnější TATAAT v poloze –132 bp, viz Joshi, Nuc. Acids Res., 15: 6643 – 6653 (1987). Box, o kterém se předpokládá, že je podobný CCAAT, se nachází v poloze –231 bp. Nukleotidová sekvence obklopující kodon počátku translace ATG (GCGACATGGC) vykazuje homologii s jinými místy počátku translace u kukuřice, jak popsali Messing a kol., Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective, Plenum Press, str. 211 – 227 (1983), ale liší se od sekvence považované za konvenční sekvenci v rostlinách (ANNATGGC), viz Joshi, výše. Předpokládaný polyadenylační signál je umístěn v poloze 3719 bp (AATAAA) genomové sekvence, 52 bp od konce cDNA. Sekvence se podobá známým sekvencím kukuřice, jak popsali Dean a kol., Nuc. Acids Res., 14: 2229 – 2240 (1986), a je umístěna 346 bp downstream od konce translace proteinu, viz Dean a kol., Nuc. Acids Res., 14: 2229 – 2240 (1986). 3'–nepřekládaná sekvence cDNA končí v poloze 3775 bp genomové sekvence.

Obrázek 27 znázorňuje výsledek analýzy genomové DNA kukuřičné linie 211D pomocí Southern blottingu s přibližným počtem kopií genu, jak se rekonstruuje za použití 8–2 cDNA genu dřeně. Restrikčního štěpení a rekonstrukce svědčí o tom, že jsou v haploidním genomu přítomny 1 až 2 kopie genu. Zdá se, že jiné geny s nižším stupněm homologie s tímto genem neexistují. Gen tedy představuje genovou rodinu kukuřice s jediným genem nebo malým počtem genů.

35 Příklad 18

„RNase protection“

40 Struktura 5'–konce mRNA se stanoví za použití metody „RNase protection“. „RNase protection“ se provádí za použití sondy představující 385 nukleotidů od +2 bp do +387 bp. Tato oblast genomového klonu se umístí do RNA–transkripčního vektoru pGEM–5Zf(+) a za použití SP6 polymerázy se vytvoří RNA–sonda značená 32P. Sonda a další báze z násobného klonovacího místa vytvoří transkript o velikosti 461 nukleotidů. Sonda se hybridizuje s celkovou R[NA] dřeně a následně se rozštěpí směsí RNasy A a T1 a chráněné fragmenty se analyzují na denaturačních polyakrylamidových gelech. Analýzou gelů se zjistí, že existuje chráněný fragment o velikosti 355 nukleotidů a další fragment o velikosti přibližně 160 nukleotidů, viz obrázek 28B.

Skutečnost, že se metodou „primer extension“ za použití primeru (č. 73) v poloze +80 bp vytvoří produkt o délce 90 nukleotidů svědčí o tom, že je 5'–konec transkriptu umístěn v poloze +1 bp. Pomocí „primer extension“ za použití primeru se v této oblasti vytvoří produkt, takže se předpokládá, že to lze též detekovat pomocí testu „RNase protection“. Tento primer je umístěn v 5'–části sondy pro „RNase protection“. cDNA–klon obsahuje sekvence přítomné na 3'–konci sondy pro „RNase protection“ a tudíž se má za to, že bude v tomto testu chráněn. Jelikož je na gelu přítomen pouze jeden pás, který může vznikat díky oběma těmito sekvencím, jsme

přesvědčení, že chráněným fragmentem je skutečně větší pás a jediný menší pás je artefaktem. Pokud by byl v této oblasti intron, byly by v sondě přítomny fragmenty z každého konce, a byly by tedy detekovatelné na gelu. Z dvou pozorovaných pásů, jeden zřejmě představuje celou 5'-oblast, a tudíž se nedomníváme, že je v této oblasti lokalizován intron.

5

Příklad 19

Komplementace TrpA-mutantu *Escherichia coli* s cDNA 8-2 dřeně

10

Kmen *Escherichia coli* CGSC kmen 5531 z centra genetického materiálu *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University (laboratorní označení kmene M5004 (O. H. Smith)) s chromozomálním markery *glnA3*, *TrpA9825*, *1-,IN(rrnD-rrnE)*, *thi-1*, jak popsali Mayer a kol., Mol. Gen. Gentet., 137: 131 – 142 (1975) se transformuje buď pomocí cDNA 8-2 dřeně (*TrpA*), nebo plazmidu Bluescript (Stratagene), jak popsali Sambrook a kol., viz výše. Transformanty obsahující cDNA 8-2 (*TrpA*) jsou schopny růstu za nepřítomnosti tryptofanu na minimálním médiu, zatímco transformanty s plazmidem Bluescript (Stratagene) nebo netransformované kontroly nejsou bez tryptofanu schopny růstu. Buňky transformované genem *TrpA* kukuřice rostou velmi pomalu, kolonie jsou viditelné po sedmi dnech růstu při teplotě místnosti. Všechny kmeny se pěstují na minimálním médiu M9 doplněném glutaminem v množství 200 µg / ml, thiaminem v množství 0,01 µg / ml a s nebo bez tryptofanu v množství 20 µg / ml. U všech transformantů se zkontroluje přítomnost příslušného plazmidu za použití analýzy pomocí restričních enzymů. Všechny kolonie rostoucí za nepřítomnosti tryptofanu obsahují klon 8-2 obsahující cDNA pro předpokládaný gen *TrpA* kukuřice, jak se potvrdí pomocí Southernovy hybridizace (údaje nejsou uvedeny). Tyto výsledky potvrzují závěr, že jde o protein podjednotky A tryptofan-syntázy kukuřice.

25

Příklad 20

30

Exprese genu

Zkoumá se exprese dřeňově preferovaného genu v rostlině. Pro zkoumání exprese tohoto genu se použijí též různé genotypy kukuřice. Jako zdroj RNA pro tato zkoumání se použijí následující tkáně: dřeň z vrchní, střední a spodní části rostliny, opěrné kořeny, včetně a palice u genotypu 5N984, dřeň z vrchní, střední a spodní části rostliny, listy staré 10 dnů, kořeny staré 14 dnů a dřeň z celé rostliny u genotypu 211D, a semena genotypu 211D, která se sklízí v týdenních intervalech jeden až pět týdnů po opylení. Dřeň ze spodní části rostliny se získá ze dvou internodií nad opěrnými kořeny, dřeň ze střední části rostliny se získá z dalších tří internodií a dřeň z horní části rostliny představuje dřeň posledních dvou internodií před vlákninou u 60 až 70 dnů starých rostlin. U 39 dnů starých rostlin jsou přítomna pouze dvě internodia a u 46 dnů starých rostlin pouze tři internodia. Analýza pomocí northern blottingu ukazuje, že se transkripty hybridizující se sondou získanou z cDNA dřeně akumulují rychle v mladé dřeni a mladých listech. Se zvyšujícím se věkem rostliny a při pohybu nahoru po stéble se množství detekovaného transkriptu podstatně snižuje, viz obrázky 25A – D. mRNA tohoto genu se nikdy nedetekuje v RNA získané ze semen, ať už se jedná o celkovou RNA nebo poly A+RNA, viz obrázek 26. Transkript se též detekuje v kořenech, včetně a obalech, ale ne v tak velkém množství jako ve tkáni dřeně a mladých listů, viz obrázky 25B, 25C. mRNA se zdetekuje i v opěrných kořenech, ale pouze ve velmi malém množství, viz obrázek 25D. Šest linií kukuřice se analyzuje ve formě nediferencovaného kalusu pomocí northern blottingu, a v žádném vzorku kalusu se nezjistí exprese tohoto genu (údaje nejsou uvedeny). Úroveň exprese daného genu je extrémně vysoká, jelikož velmi silný signál sondy z genu 8-2 *TrpA* lze detekovat ve dřeni a listech už pouhé dvě hodiny po expozici výsledků blottingu na film (obrázek 25A). Množství vytvořené mRNA je srovnatelné s množstvím získaným z jiného vysoce exprimovaného kukuřičného genu, a to

50

kukuřičného genu fosfoenolpyruvát-karboxylázy, jak popsali Hudspeth a kol., Plant Mol. Biology, 12: 579 – 589 (1989).

- 5 Exprese tohoto genu není stálá v čase. Exprese je velmi vysoká v dřeni spodní a střední části rostliny u rostlin starých méně než 60 dnů a rychle se snižuje v blízkosti vrcholu rostliny. Jak rostlina zraje, například je-li rostlina starší než 70 dnů, exprese klesá na téměř nezdetekovatelnou úroveň, kromě exprese ve dřeni ze spodní části rostliny a vřetenu. Akumulace transkriptu v mladých listech je téměř tak vysoká jako ve dřeni ze spodní části rostliny, ale exprese rychle klesá a v listech starších než 40 dnů je transkript nezdetekovatelný. Bylo zjištěno, že exprese
10 v listech se mění v závislosti na ročním období pěstování.

Níže uvedené příklady 21 až 39 se zaměřují na izolaci, charakterizaci a analýzu exprese pylově specifického promotoru podle vynálezu.

- 15 Identifikace pylově specifických proteinů

Příklad 21

- 20 Růst rostlin kukuřice

Rostliny kukuřice (*Zea mays*, inbrední linie Funk 211D) se pěstují ze semen ve směsi vermikulitu a písku ve skleníku při světelném režimu 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

25

Příklad 22

Izolace celkového pylového proteinu

- 30 Zralý pyl se izoluje z rostlin kukuřice v době maximálního uvolňování pylu. Prosije se, zmrazí v kapalném dusíku, a 3 až 4 ml zmraženého pylu se rozmělní v třecí misce a rozetřou se stejným objemem skleněných kuliček o průměru 75 až 150 μm . Přidá se 40 ml pufru pro rozmělnění (2mM kyselina ethylendiamintetraoctová, 5mM dithiothreitol, 0,1% dodecylsulfát sodný, 100 mM Hepes pH 8) a směs se znovu tře. Skleněné kuličky a neporušená pylová zrna se odstraní
35 pomocí centrifugace při nízké rychlosti a směs se vyčechří centrifugací při 10 000 g po dobu 15 minut. Protein se vysráží ze supernatantu přidáním acetonu na konečnou koncentraci 90 %.

Příklad 23

40

Izolace proteinu pylové exiny

Protein exiny se izoluje z uvolněného pylu kukuřice 211D jak popsali Matousek a Tupy, J., Plant Physiology 119: 169 – 178 (1985).

45

Příklad 24

Izolace proteinů listů

50

Mladé listy (rozvinuté z přibližně 60 %) se odříznou od rostliny kukuřice a odstraní se střední žebro listů. Celkový protein se izoluje jako v případě pylu, s tím rozdílem, že se materiál nemrazí a rozmělní se provádí v míchačce Waring bez skleněných kuliček.

55

Příklad 25

Izolace proteinu zrna

- 5 Palice s plně vyvinutými, ale stále vlhkými zrny se odstraní z rostliny a zrna se odřezou skalpelem. Celkový protein se izoluje jako v případě listů.

Příklad 26

10

Elektroforéza proteinů kukuřice v gelu.

- Proteiny pylu, listů a zrna se oddělí na SDS–polyakrylamidovém gelu, jak popsali Sambrook a kol., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York (1989). Po obarvení modrým barvivem (Coomasie) se proteinové pásy z pylu, listů a zrna porovnají a hojně přítomné proteiny o velikosti přibližně 10 kD, 13 kD, 20 kD, 45 kD, 55 kD a 57 kD se určí jako pylově specifické.

Identifikace pylově specifických cDNA–klonů

20

Příklad 27

Částečné stanovení sekvence pylově specifických proteinů

25

- Proteinové pásy určené jako pylově specifické se purifikují pomocí elektroblottingu z polyakrylamidového gelu na membránu PVDF (Matsudaira, P., J. Biol. Chem. 261: 10035 – 10038 (1987)) nebo pomocí kapalinové chromatografie s vysokou rozlišovací schopností na reverzní fázi. N–koncová sekvence purifikovaných proteinů se stanoví pomocí automatické degradace (Edman) na sekvenátoru pracujícím s plynnou fází Applied Biosystems 470A. Fenylothiohydantoinové (PTH) aminokyseliny se identifikují za použití analyzátoru Applied Biosystems 120A PTH. Pro stanovení celé sekvence se proteiny rozštěpí endoproteinázou Lys–C (Boehringer Mannheim) v 0,1M Tris–HCl, pH 8,5, přičemž se proteináza nechá působit po dobu 24 hodin při teplotě místnosti za použití poměru enzymu a substrátu 1 : 10. Výsledné peptidy se izolují pomocí kapalinové chromatografie s vysokou rozlišovací schopností za použití kolony Aquapore C–8 vymývané lineárním gradientem (0 až 60 %) směsi acetonitrilu a izopropanolu (v poměru 1 : 1) v 0,1% kyselině trifluoroctové. Sekvence izolovaných peptidů Lys–C se určí jak je popsáno výše. Pro pylově specifický protein o velikosti 13 kD se stanoví následující sekvence:

35

N–konec:	TTPLTFQVGKSGKPGHLILTPNVATI
LysC 61:	KPGHLILTPNVATISDVVIK
LysC 54:	SGGTRIADDVIPADFK
LysC 49:	EHGGODESF TLK
LysC 43:	EGPTGTWTLDTK

Příklad 28

Syntéza oligonukleotidových sond pro pylově specifické cDNA

- 5 Vyberou se oblasti peptidové sekvence v proteinu o velikosti 13 kD o nízké redundanci kodonů, a na syntetizátoru Applied Biosystems 380A se syntetizují vhodné oligonukleotidové sondy pro gen kódující tyto oblasti. Syntetizují se následující oligomery:

Oligomer č.51

5'-AA ATC ATC ACC ACC ATG TTC-3'

G G G G C

T

C

Oligomer 8.58

5'-CC TTT ACC CAC TTG AAA-3'

C G C G

T

C

- 10 přičemž nukleotidy ve sloupcích nad sebou představují báze, které se inkorporují náhodně ve stejných poměrech na naznačeném místě v oligomeru. Oligomer č.51 kóduje aminokyselinovou sekvenci EHGGDDF nacházející se v peptidu LysC 49, a oligomer č.58 kóduje aminokyselinovou sekvenci FQVGKG nacházející se v N-koncovém peptidu. Použití této směsi oligonukleotidů k vyhledávání pylově specifického genu v cDNA-knihovně je popsáno níže.

15 **Příklad 29**

Konstrukce cDNA–knihovny kukuřičného pylu

- 20 Celková kukuřičná RNA z uvolněného pylu kukuřice 211D se izoluje jak popsali Glisen a kol.,
Biochemistry 13: 2633 – 2637 (1974). Poly A+ mRNA se purifikuje z celkové RNA jak popsali
Sambrook a kol. Z této mRNA se připraví cDNA za použití soupravy pro syntézu cDNA od
firmy Promega, podle postupů dodávaných se soupravou. K této cDNA se přidají linkery EcoRI
a cDNA se liguje do ramen klonovacího vektoru lambda Zap od firmy Stratagene za použití
25 postupu dodávaného výrobcem. Produkt ligace se sbalí v extraktu pro „packaging“ fága lambda
(lambda packaging extract) též od firmy Stratagene a použije se pro infekci buněk Escherichia
coli BB4.

30 **Příklad 30**

Izolace pylově specifických cDNA–klonů

- 35 cDNA–knihovna pylu kukuřice se zkoumá za použití syntetických oligonukleotidových sond specifických pro gen proteinu o velikosti 13 kD, jak popsali Sambrook a kol. Ve stručnosti, přibližně 100 000 fágových plaků cDNA–knihovny pylu se nanese na desky a přesaje na nitrocelulóзовé filtry. Filtry se analyzují za použití oligonukleotidů č.51 a č.58, které se koncově

označí 32P za použití polynukleotid-kinázy, jako sond. Sondy se nechají hybridizovat na filtrech při nízké přísnosti (50 °C v 1mM chloridu sodném, 10% dextran-sulfátu, 0,5% dodecylsulfátu sodném), promývají se po dobu 30 minut při teplotě místnosti a poté po dobu 30 minut při teplotě 45 °C v 6X citrátovém pufru s chloridem sodným (SSC), 0,1% dodecylsulfátu sodném a exponují na film citlivý na paprsky X, pro identifikaci pozitivních klonů. Předpokládané klony se purifikují pomocí čtyřikrát opakované plakové hybridizace. Izolují se tři třídy cDNA-klonů. Typ I obsahuje fragmenty EcoRI o velikosti 0,2 kb a 1,8 kb. Typ II obsahuje fragmenty EcoRI o velikosti 0,6 kb, 0,5 kb a 1,0 kb, a Typ III obsahuje fragment EcoRI o velikosti 2,3 kb.

Příklad 31

Charakterizace pylově specifických cDNA-klonů

Fragmenty EcoRI cDNA-klonu typu II se subklonují do plazmidového vektoru pBluescript SK+, od firmy Stratagene, viz obrázek 29. Fragment o velikosti 0,6 kb ve vektoru pBluescript se označí II-.6, fragment o velikosti 0,5 kb ve vektoru pBluescript se označí II-.5 (později se přejmenuje na pCIB3169) a fragment o velikosti 1,0 kb ve vektoru pBluescript se označí II-1.0 (později se přejmenuje na pCIB3168). Jak je popsáno níže, kódují fragmenty o velikosti 0,5 kb a 1,0 kb pylově specifický gen kalcium-dependentní fosfát-kinázu kukuřice. RNA z prašníků, pylu, listů, kořenů a vláken se denaturuje glyoxalem, elektroforézuje se na 1% agarózovém gelu, přenesou na nitrocelulózu a odděleně se provede analýza pomocí sond, kterými jsou uvedené tři fragmenty EcoRI označené 32P za použití náhodné extenze primerů („random primer extension“), jak popsali Sambrook a kol., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York (1989). Provede se expozice filmu citlivého na paprsky X, a zjistí se, že pás mRNA o velikosti přibližně 1,5 kb se identifikuje se sondou tvořenou fragmentem o velikosti 0,6 kb, zatímco fragmenty o velikosti 0,5 a 1,0 kb hybridizují s mRNA o velikosti přibližně 2,0 kb. Ve všech případech k hybridizaci dochází pouze u dráhy s pylovou RNA, s tou výjimkou, že fragment o velikosti 0,6 kb vykazuje slabý signál u mRNA prašníků. Z těchto údajů lze vyvodit závěr, že původní cDNA-klon představuje fúzi molekul cDNA získanou ze dvou různých mRNA. Fragment o velikosti 0,6 kb je částečnou cDNA pylově specifické mRNA o velikosti 1,5 kb, přičemž tato mRNA kóduje peptid LysC 49 a N-koncový peptid. Fragmenty o velikosti 1,0 a 0,5 kb představují částečnou cDNA pylově specifické mRNA o velikosti 2,0 kb nesouvisející s uvedenými peptidy a používanými oligonukleotidovými sondami. Tento závěr se ověří sekvenováním fragmentů za použití postupu využívajícího dideoxyribonukleotidů jako terminátorů reakce, jak popsali Sambrook a kol. Sekvence cDNA je znázorněna na obrázku 30.

Příklad 32

Stanovení specifické exprese mRNA

Pro stanovení, zda je RNA o velikosti 2,0 kb představovaná cDNA-klony pCIB3169 a pCIB3168 přítomna pouze v pylu, se izoluje celková RNA z kořenů, listů, pylu, prašníků nebo vláken kukuřice 211D. RNA se denaturují glyoxalem, elektroforézuje na 1% agarózovém gelu, přenesou na nitrocelulózu a analyzují za použití inzertu EcoRI z plazmidu pCIB3168 nebo pCIB3169 označeného 32P jako sondy, přičemž se ve všech krocích používají standardní postupy, které popsali Sambrook a kol., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York (1989). Expozice na fotografický film ukazuje, že je gen představovaný těmito dvěma klony transkripčně aktivní pouze v pylu (viz obrázek 31).

Identifikace pylově specifického promotoru

Příklad 33

Konstrukce knihovny genomové DNA kukuřice

- 5 Genomová DNA z mladých výhonků kukuřičné linie 211D se izoluje jak popsali Shure a kol., Cell 35: 225 – 233 (1983). DNA se dodá firmě Stratagene, kde se zkonstruuje knihovna genomové DNA pomocí klonování DNA částečně rozštěpené Sau3AI do klonovacího vektoru Lambda Dash (Stratagene).

10

Příklad 34

Hybridizace genomové DNA po blottingu, pro stanovení počtu kopií genu

- 15 Genomová DNA z kukuřičné linie 211D se rozštěpí řadou restrikčních enzymů, výsledky jednotlivých štěpení se elektroforézují na agarózovém gelu, přenesou na nitrocelulózu a analyzují za použití inzertu EcoRI značeného 32P z plazmidu pCIB3168 (fragment o velikosti 1,0 kb), plazmidu pCIB3169 (fragment o velikosti 0,5 kb) nebo klonu II–.6 jako sondy, za použití standardních postupů, které popsali Sambrook a kol. Sondou II–.6 se detekuje více než 10 pásů
- 20 ve většině štěpení, což svědčí o tom, že je tato cDNA získaná z velké multigenové rodiny. Fragmentem o velikosti 1,0 kb jako sondou se detekuje 3 až 6 pásů, a fragmentem o velikosti 0,5 kb se detekují pouze 1 až 3 pásy, které jsou podmnožinou pásů detekovaných pomocí fragmentu o velikosti 1,0 kb. Díky menší velikosti genové rodiny detekované fragmenty o velikosti 1,0 kb a 0,5 kb bylo rozhodnuto pokusit se o izolaci genomového klonu, který jim
- 25 odpovídá.

Příklad 35

- 30 Izolace pylově specifického genomového klonu

Screening genomové knihovny kukuřice 211D (Stratagene) se provede pomocí analýzy přesátých plaků za použití inzertů značených 32P z plazmidu pCIB3168 (fragment o velikosti 1,0 kb) a pCIB3169 (fragment o velikosti 0,5 kb) jako sond, za použití standardních postupů, které jsou

35 popsány v manuálu firmy Stratagene dodávaném s knihovnou. Za použití těchto postupů se izoluje Lambda–klon MG14, který hybridizuje s oběma sondami. Fragment BamHI z MG14 o velikosti 9,0 kb, který též hybridizuje s oběma sondami, se subklonuje do místa BamHI vektoru pBluescript SK+, čímž se vytvoří plazmid pCIB379. 1800 bp z pCIB379, v oblasti odpovídající sekvenci cDNA, se sekvenuje jak je popsáno výše. Porovnáním sekvence cDNA a genomové

40 sekvence se zjistí identita pouze 91 %. Inzert pCIB379 představuje příbuzný pylově specifický gen,

druhá genomová knihovna kukuřice 211D se zkonstruuje ve vektoru lambda GEM–11, od firmy Promega, za použití postupů popsáných v manuálu firmy Promega. Screeningem této

45 neamplifikované knihovny, jak je popsáno výše, se získá klon GEM11–1, který hybridizuje s oběma sondami o velikosti 0,5 kb a 1,0 kb. Fragment HindIII z GEM11–1 o velikosti 20 kb, který též hybridizuje s oběma sondami, se subklonuje do místa HindIII vektoru pBluescript SK+, čímž se získá pCIB3166. Stanoví se sekvence DNA části pCIB3166 o velikosti 4,1 kb (viz obrázek 35), a ta je po vyhledání šesti intronů v genomovém klonu 100% identická se sekvencí

50 cDNA z pCIB3168 a pCIB3169. Porovnáním sekvence pCIB3166 s databází Genbank/EMBL se zjistí, že 5'–koncová část přes exon 3 je ze 34,6 % identická s kalmodulin–dependentní protein–kinázou II krysy, pokud se týká aminokyselin (obrázek 32), zatímco čtvrtý až sedmý exon je ze 39,4 % identický s kalmodulinem krysy, viz obrázek 33. Dosud nebyla popsána žádná jiná pylově specifická kináza a do té doby nebyl znám protein kombinující kinázové

55 a kalmodulinové domény. Následně popsali Harper a kol., Science 252: 951 – 954 (1991)

sekvenci cDNA podobného proteinu ze sóji, ačkoli exprese tohoto genu není pylově specifická. Porovnáním kalcium–dependentní protein–kinázy (CDPK) sóji a CDPK pylu kukuřice se zjistí, že jsou, pokud se týká sekvence aminokyselin, ze 38 % identické, viz obrázek 34.

5

Příklad 36

Identifikace místa počátku transkripce promotoru pomocí „primer extension“

10 Jako primer se syntetizuje oligonukleotid PE51, s následující sekvencí:

5' -TGGCCCATGGCTGCGGCGGGGAACGAGTGCGGC-3'

Analýza „primer extension“ se provádí na poly A+ mRNA pylu, jak popsali Metraux a kol., PNAS USA 86: 896 – 890 (1989). Určí se, že se místo iniciace transkripce nachází mezi bázemi 1415 a 1425 na částečné sekvenci pCIB3166, jak je uvedeno na obrázku 35.

15

Testování funkce promotoru v transgenických rostlinách

Příklad 37

20

Konstrukce promotorových vektorů pro transformaci rostlin

Pro demonstraci, že promotor pylové CDPK může řídit v transgenických rostlinách expresi připojeného genu, se zkonstruuje genová fúze promotoru pylové CDPK s genem beta–glukuronidázy z *Escherichia coli*, za použití následujícího postupu. Fragment BamHI z lambda GEM11–1 o velikosti 10 kb obsahující první exon a část prvního intronu genu pylové CDPK a 9 kb upstream genu se subklonuje do místa BamHI vektoru pBluescript SK+, čímž se vytvoří plazmid pCIB3167. Fragment BamHI – Hind III z pCIB3167 o velikosti 2,3 kb se subklonuje do místa BamHI a HindIII vektoru pBluescript SK+, čímž se vytvoří plazmid pSK105. pSK105 se rozštěpí Aval a HindIII a fragment HindIII – Aval o velikosti 1,75 g se izoluje na agarózovém gelu. Za standardních podmínek se provede polymerázová řetězová reakce, jak popsali Sambrook a kol., za použití neporušeného pSK105 jako matrice a následujících primerů:

30

č. 42: 5' -AGCGGTCGACCTGCAGGCATGCGATCTGCACCTCCCGCCG-3'

č. 43: 5' -ATGGGCAAGGAGCTCGGG-3'

35 Produkty polymerázové řetězové reakce se rozštěpí Ava I a Sall a výsledný fragment se izoluje na agarózovém gelu. Vektor pBluescript SK+ se rozštěpí HindIII a Sall. Fragment HindIII – Aval o velikosti 1,75 g, fragment Aval – Sall získaný pomocí polymerázové řetězové reakce a vektor pBluescript s konci HindIII a Sall se ligují pomocí ligace tří částí, čímž se získá plazmid pSK110.

40 Fúze promotorového fragmentu v pSK110 s genem beta–glukuronidázy (GUS) se vytvoří pomocí rozštěpení pSK110 HindIII a Sall, izolace fragmentu o velikosti 1,9 kb na agarózovém gelu a jeho ligace do míst HindIII a Sall pCIB3054, čímž se vytvoří plazmid pKL2, plazmid odvozený od pUC19 obsahujícího gen GUS následovaný rostlinným intronem z genu fosfoenolpyruvát–karboxylázy a polyadenylačním signálem z viru mozaiky kvěťáku. Tato promotorová fúze je
45 v rostlinách neaktivní, pravděpodobně kvůli přítomnosti kodonů ATG mimo rámec, ve vedoucí sekvenci předcházející ATG genu GUS.

Funkční fúze promotoru se vytvoří pomocí rozštěpení pKL2 XbaI a Sall, pro odstranění místa spojení předchozí fúze. Nové místo spojení fúze se vytvoří polymerázovou řetězovou reakcí za použití pSK105 jako matrice a následujících primerů:

č. SK50: 5' -CCCTTCAAATCTAGAAACCT-3'

č. SK49: 5' -TAATGTCGACGAACGGCGAGAGATGGA-3'

- 5 Produkt polymerázové řetězové reakce se rozštěpí XbaI a Sall a purifikuje na agarózovém gelu. Purifikovaný fragment se liguje do míst XbaI a Sall v pKL2, čímž se vytvoří plazmid pCIB3171. Tento plazmid obsahuje funkční fúzi promotoru pylové CDPK a GUS, která řídí expresi genu GUS výhradně v pylu.
- 10 Pro vytvoření vektoru obsahujícího fúzi promotor pylové CDPK – GUS vhodného pro transformaci rostlin zprostředkovanou *Agrobacterium tumefaciens*, se izoluje fúzní gen z pCIB3171 pomocí štěpení HindIII a Sall. Výsledný fragment se liguje do míst HindIII a Sall v pBI101 (od firmy Clontech), čímž se vytvoří plazmid pCIB3175.

15

Příklad 38

Vytvoření transgenických rostlin

- 20 pCIB3175 se transformuje do *Agrobacterium tumefaciens* obsahujícího pomocný plazmid (helper plazmid) pCIB542, a výsledná kultura se použije k transformaci listových terčů z kultur vrcholu výhonků tabáku, jak popsali Horsch a kol., Science 227: 1129 – 1231 (1985), s tím rozdílem, že se vynechají pěstitelské kultury (nurse cultures) a selekce se provádí pomocí kanamycinu v množství 100 mg / l. Transgenické rostliny se regenerují a přítomnost transgenů se
- 25 ověří pomocí polymerázové řetězové reakce.

Příklad 39

Analýza exprese genu GUS

- 30 U pylu z primárních transformantů a jejich potomstva se histochemicky analyzuje exprese genu GUS, jak popsali Guerrero a kol., Mol. Gen. Genet. 224: 161 – 168 (1990). Procento pylových zrn exprimujících gen GUS, což se dokáže modrým zbarvením v pufru X-gluc, je uvedeno
- 35 v tabulce níže:

Číslo rostliny	% modrého pylu
PP1-51	28 %
PP1-54	54 %
PP1-55	žádné
PP1-61	velmi málo
PP1-63	51 %
PP1-67	15 %
PP1-80	10 %
PP1-83	12 %

Primární transformanty, do kterých byla integrována jediná fúze promotor pylové CDPK – gen GUS tvoří maximálně 50 % GUS–pozitivního pylu, kvůli segregaci jediného genu.

40

Na tkáni pylu, stonků, kořenů, listů a pestíků se lektovaných rostlin se provedou fluorometrické GUS-testy, kvůli demonstraci specifčnosti exprese promotoru pylové CDPK. Testy se provádí jak popsal Jefferson, Plant Mol. Biol. 14: 995 – 1006 (1990), a hodnoty aktivity GUS se vyjádří v nmolech MU / μ g proteinu / minutu.

5

Číslo rostliny	Tkáň	Aktivita GUS	Aktivita GUS u netransformovaných rostlin	Čistá aktivita GUS
PP1-51	stonek	0,01	0,02	0
	list	0	0	0
	kořen	0,15	0,10	0,05
	pestík	0,02	0,01	0,01
	pyl	0,24	0,02	0,22
PP1-54	stonek	0,01	0,02	0
	list	0	0	0
	kořen	0,13	0,1	0,03
	pestík	0,01	0,01	0
	pyl	0,6	0,02	0,58
PP1-63	stonek	0,01	0,02	0
	list	0	0	0
	kořen	0,07	0,1	0
	pestík	0,01	0,01	0
	pyl	0,57	0,02	0,55

Příklady 40 až 50 se zaměřují v první řadě na přípravu chimérických konstruktů, tj. rekombinantních molekul DNA, obsahujících konstitutivní, tkáňově preferovaný nebo tkáňově specifický promotor operabilně spojený s připraveným genem B.t., inzerci těchto konstruktů do vektorů, vytváření transgenických rostlin obsahujících tyto vektory a analýzu úrovně exprese proteinů B.t. v transgenických rostlinách.

10

Příklad 40

15

Konstrukce transformačních vektorů obsahujících gen Bt optimalizovaný pro kukuřici.

K demonstraci efektivity syntetického genu Bt cryIA(b) v kukuřici se se syntetickým gen Bt cryIA(b) fúzují PepC a dřeňově specifické promotory za použití polymerázové řetězové reakce. Oligomery vytvořené pro fúzi pomocí polymerázové řetězové reakce jsou:

20

(PepC)

KE99A28 = 5'-TGCGGTTACC GCCGATCACATG-3'

KE97A28 = 5'-GCGGTACCGC GTCGACGCGG ATCCGCGGC GGAAGCTAAG-3'

(Dřeňově specifický)

KE100A28 = 5'-GTCGTCGACC GCAACA-3'

KE98A28 = 5'-GCGGTACCGC GTTAACGCGG ATCCTGTCCG ACACCGGAC-3'

KE104A28 = 5'-GATGTCGTCG ACCGCAACAC-3'

KE103A28 = 5'-GCGGTACCGC GGATCCTGTC CGACACCGGA CGGCT-3'

Primery pro polymerázovou řetězovou reakci se vytvoří tak, že se místa Nco I v 5'-nepřekládané vedoucí oblasti každého z těchto tkáňově specifických genů (obsahující místa počátku translace ATG) nahradí místy Bam HI, pro usnadnění klonování syntetického genu cryIA(b) do tohoto místa Bam HI. Následná konstrukce vektorů obsahujících tkáňově specifické promotory fúzované se syntetickým genem cryIA(b) a též obsahujících markerový gen 35S : PAT : 35S zahrnuje několik konstruktů jako meziproduktů.

1. pCIB4406 (35S : syntetický cryIA(b) : pepC ivsč.9 : 35S)

pCIB4406 obsahuje syntetický gen cryIA(b) o velikosti 2 kb s konci Bam HI a Cla I fúzovaný s promotorem CaMV 35S (Rothstein a kol., Gene 53: 153 – 161 1987)). Gen též obsahuje intron č.6 získaný z genu fosfoenolpyruvát-karboxylázy kukuřice (ivsč.9) v 3'-nepřekládané oblasti genu, kde se používá 3'-konec CaMV (PNAS USA, 83: 2884 – 2888 (1986), Hudspeth a kol., Plant Molecular Biology, 12: 579 – 589 (1989)). pCIB4406 se liguje a transformuje do buněk Escherichia coli kmene „SURE“ (Stratagene, La Jolla, Kalifornie), jak je popsáno výše. V genu cryIA(b) z pCIB4406 se nachází jedna mutace v místě aminokyseliny č. 436, která má za následek změnu požadované aminokyseliny fenylalaninu na leucin. pCIB4406 je při testování v biologických testech na hmyzu plně aktivní proti Ostrinia nubilalis, a produkuje protein CryIA(b) očekávané velikosti, jak se stanoví pomocí analýzy western blottingem.

2. pCIB4407 (35S : syntetický cryIA(b) : pepC ivsč.9: 35 S + 35S : PAT : 35S)

pCIB4407 se vytvoří z fragmentu Hin III / Eco RI o velikosti přibližně 4 kb obsahujícího gen 35S : PAT : 35S, a fragmentu Hind III / Eco RI o velikosti 3,1 kb obsahujícího gen 35S : syntetický cryIA(b) : 35S z pCIB4406. pCIB4407 se liguje a transformuje do Escherichia coli kmenů „SURE“, DH5alfa a HB101 za použití standardních postupů (Sambrook a kol.). Syntetický gen cryIA(b) má stejné vlastnosti jako jeho prekurzor pCIB4406.

3. pCIB4416 (35S : syntetický cryIA(b) : pepC ivsč.9: 35 S + 35S : PAT : 35S + 35S : Adh intron : GUS : 35S)

pCIB4407 se rozštěpí Eco RI a ošetří alkalickou fosfatázou ze střeva telat (CIP) za standardních podmínek (Sambrook a kol.), čímž se získá fragment o velikosti přibližně 7,2 kb, který se liguje s fragmentem Eco RI 35S : Adh / GUS : 35S o velikosti 3,4 kb, čímž se vytvoří pCIB4416. Ligace a transformace do buněk „SURE“ se provede jak je popsáno výše. Syntetický gen cryIA(b) v pCIB4416 má stejné vlastnosti jako gen v pCIB4406.

4. pCIB4418 (35S : syntetický cryIA(b) : pepC ivsč.9 : 35S)

pCIB4406 se rozštěpí Apa I a Bam HI a ošetří CIP. pCIB4406 se rozštěpí Bam HI a Nsp I, a pBS123#13 se rozštěpí Nsp I a Apa I. Pomocí ligace tří částí se z fragmentu Apa I / Bam HI o velikosti 4,3 kb z pCIB4406, fragmentu Bam HI / Nsp I o velikosti 1,3 kb z pCIB4406 a fragmentu Nsp I / Apa I z pBS123#13 vytvoří pCIB4418. Hostitelský kmen Escherichia coli pro pCIB4418 je HB101.

5. pCIB4419 (35S : syntetický cryIA(b) : pepC ivsč.9 : 35S + 35S : PAT : 35S + 35S : Adh intron : GUS : 35S)

5 pCIB4416 a pCIB4418 se rozštěpí Bst E II a Eco NI a fragmenty pCIB4416 se ošetří CIP. Fragment o velikosti 9,1 kb z pCIB4416 se liguje s fragmentem o velikosti 1,4 kb z pCIB4418, čímž se vytvoří pCIB4419. pCIB4419 po transformaci do kompetentních buněk *Escherichia coli* kmen HB101 vykazuje v biologických testech na hmyzu plnou aktivitu proti *Ostrinia nubilalis*.

10 6. pCIB4420 (dřeňový promotor : syntetický cryIA(b) : PEPC ivsč.9 : 35S + 35S : PAT : 35S)

Intermediární konstrukty při vytváření pCIB4420 jsou pBtin1, pBtin2, p4420A a pBtin3. pBtin1 (dřeňový promotor : druhá polovina syntetického genu Bt + 35S : PAT : 35S) se vytvoří ligací fragmentu dřeňového promotoru Xba I / Nco I o velikosti 2,1 kb z plazmidu pith(3-1) s fragmentem Xba I / Nco I o velikosti 5,2 kb z pCIB4407. pBtin2 je intermediárním konstruktem obsahujícím dřeňový promotor modifikovaný fragmentem o velikosti 210 bp vytvořeným pomocí polymerázové řetězové reakce za použití primerů KE100A28 a KE98A28 uvedených výše. Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci obsahuje přibližně 100 ng fragmentu dřeňového promotoru Bam HI / Nco I o velikosti 2,1 kb se 100 pmoly každého z oligomerů, 200 nM každého z deoxyribonukleotidtrifosfátů, 1X pufr (Cetus) a 2,5 jednotek teplotně stabilní polymerázy. Jelikož je poloviční teplota denaturace (T_m) relativně nízká (mezi 40 °C a 50 °C), provádí se polymerázová řetězová reakce s následujícími parametry:

denaturace: 94 °C po dobu 1 minuty,
25 teplotní hybridizace: 37 °C po dobu 1 minuty,
extenze: 72 °C po dobu 45 sekund (+ 3 sekundy na cyklus),
počet cyklů: 25.

Reakční směs po polymerázové řetězové reakci se ošetří proteinázou K, jak je popsáno výše, rozštěpí se Sal I a Kpn I, a poté se provede extrakce fenolem a chloroformem a vysrážení ethanolem, jak je popsáno výše. Fragment o velikosti 210 bp se purifikuje na 2% Nusieve-gelu a extrahuje z gelu za použití filtračních jednotek Millipore. Fragment Sal I / Kpn I o velikosti 210 bp se liguje s fragmentem Sal I / Kpn I o velikosti 4,9 z pith(3-1), čímž se vytvoří pBtin2.p4420A (dřeňový promotor : syntetický Bt : Pep intron : 35S + 35S : PAT : 35S) se vytvoří pomocí ligace tří částí z fragmentu Nsi I / Bam HI o velikosti 700 bp z pBtin2, fragmentu Bam HI / Bst E II o velikosti 1,8 kb z pCIB4418, a fragmentu Bst E II / Nsi I o velikosti 5,9 kb z pBtin1. Po vytvoření p4420A se v pBtin2 objeví tři mutace. Za použití primerů KE104A28 a KE103A28 s hodnotami T_m přibližně 65 °C se získá druhý fragment vytvořený pomocí polymerázové řetězové reakce, aby se modifikovalo místo Nco I ve vedoucí části dřeňového promotoru. Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci je identická s výše uvedenou směsí, s tím, že se přidá glycerol na koncentraci 20 %, aby se snížil výskyt mutací v oblastech bohatých na G + C (Henry a kol., *Plant Molecular Biology Reporter* 9 (2): 139 – 144, 1991). Parametry polymerázové řetězové reakce jsou následující:

45 Část I: 94 °C: 3 minuty, 1 cyklus

Část II: 60 °C: 1 minuta,
94 °C: 1 minuta,
25 cyklů,

50 Část III: 72 °C: 5 minut, 1 cyklus.

Reakční směs se po polymerázové řetězové reakci ošetří jak je uvedeno výše a rozštěpí se restrikčními endonukleázami Sal I a Kpn I. Fragment Sal I / Kpn I o velikosti 210 bp vytvořený pomocí polymerázové řetězové reakce (při použití glycerolu v reakci) se liguje s fragmentem

Sal I / Kpn I o velikosti 4,9 kb z plazmidu pith(3-1), čímž se vytvoří pBtin3. Údaje získané sekvenováním pBtin3-G#1 svědčí o tom, že je tento fragment vytvořený pomocí polymerázové řetězové reakce správný.

- 5 pBtin3-G#1 se použije pro vytvoření pCIB4420 (též nazývaného p4420B-G#6). pCIB4420 se zkonstruuje pomocí ligace tří částí za použití fragmentu Nsi I / Bam HI o velikosti 700 bp z pBtin3-G#1, fragmentu Bam HI / Bst E II o velikosti 1,8 kb z pCIB4418 a fragmentu Bst E II / Nco I o velikosti 5,9 kb z pBtin1. pCIB4420 se použije v pokusech na protoplastech mesofylu a vykazuje plnou aktivitu syntetického genu cryIA(b) proti *Ostrinia nubilalis*.

10

7. pCIB4413 (PEPC : syntetický Bt (mutace Phe) : PEPC intron : 35S)

- 15 Pomocí polymerázové řetězové reakce se za použití primerů KE99A28 a KE97A28 a fragmentu Hind III / Sal I o velikosti 2,3 kb z pGUS4.5 jako matrice vytvoří fúzní fragment. Směs pro polymerázovou řetězovou reakci obsahuje primery, matrici, deoxyribonukleotidfosfáty, soli a teplotně stabilní polymerázu, ve stejných koncentracích jako je uvedeno výše. Polymerázová řetězová reakce má následující parametry:

- 20 denaturace: 94 °C po dobu 1 minuty,
teplotní hybridizace: 55 °C po dobu 1 minuty,
extenze: 72 °C po dobu 45 sekund (+ 3 sekundy na cyklus),
počet cyklů: 30.

- 25 Po dokončení polymerázové řetězové reakce se reakční směs ošetří proteinázou K, poté se provede extrakce fenolem a chloroformem a vysrážení ethanolom, jak je popsáno výše, a následně rozštěpení restričními endonukleázami Bam HI a Bst E II.

- 30 pCIB4413 se vytvoří pomocí ligace tří částí za použití fragmentu Bam HI / Bst E II o velikosti 210 bp vytvořeného pomocí polymerázové řetězové reakce, fragmentu Bam HI / Hind III o velikosti 4,7 kb z pCIB4406, a fragmentu Hind III / Bst E II o velikosti 2,2 kb z pGUS4.5.

8. pCIB4421 (PEPC : syntetický cryIA(b) : PEPC intron : 35S)

- 35 Pro nahrazení syntetického genu cryIA(b) obsahujícího mutaci v případě aminokyseliny fenylalaninu v pCIB4413 syntetickým genem cryIA(b) z pCIB4419 se vytvoří pCIB4421, a to ligací fragmentu Bam HI / Sac I o velikosti 5,2 kb z pCIB4413 s fragmentem Bam HI / Sac I o velikosti 1,9 kb z pCIB4419.

9. pCIB4423 (PEPC : syntetický cryIA(b) : PepC intron : 35S + 35S : PAT : 35S)

- 40 Fragment Bam HI / Hind III o velikosti 2,4 kb promotoru PEPC z pCIB4421 se liguje s fragmentem Bam HI / Hind III o velikosti 6,2 kb z pCIB4420, čímž se vytvoří pCIB4423. Místo Hind III se při klonování pCIB4423 deletuje exonukleázami. pCIB4423 obsahuje syntetický gen cryIA(b) pod kontrolou promotoru PEPC a gen PAT pod kontrolou promotoru 35S.

45

10. Syntetický gen cryIA(b) v kmenech *Agrobacterium*

- 50 Kmeny *Agrobacterium* obsahující syntetický gen cryIA(b) umožňují přenos tohoto genu do řady dvouděložných rostlin. Vektor pCIB4417 pro *Agrobacterium* obsahuje fragment Hind III / Eco RI o velikosti 3,3 kb 35S : syntetický CryIA(b) : PepC ivsč.9 : 35S z pCIB4406 (se zmutovaným Phe), ligovaný s fragmentem Hind III / Eco RI o velikosti 14 kb z pBI101 (Clontech). Za použití elektroporace se pCIB4417 přenesl do kmene *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Diethard a kol., *Nucleic Acids Research*, svazek 17: č. 16: 6747, 1989).

- Elektroporace 200 ng pCIB4417 a 40 μ l kompetentních buněk LBA4404 rozmrazených na ledu se provede v předem ochlazené elektroporační kyvetě o velikosti 0,2 cm (Bio-Rad Laboratories Ltd.). Za použití přístroje Gene Pulser-TM s jednotkou Pulse Controller unit (Bio-Rad) se bezprostředně použije elektrický impuls při nastavení napětí na 2,5 kV, a nastavení kapacity na 25 μ F. Po impulsu se buňky okamžitě přenesou do 1 ml média YEB, třepou se po dobu 3 hodin při teplotě 27 °C, a poté se 10 μ l směsi nanese na desky ABmin : Km50. Po inkubaci po dobu přibližně 60 hodin při teplotě 28 °C se vyberou kolonie pro miniscreening za použití analýzy pomocí restrikčních enzymů. Výsledný kmen *Agrobacteria* se označí pCIB4417:LBA4404.

10

Příklad 41

ELISA-test transformovaných protoplastů kukuřice

- 15 Přítomnost toxinu proteinu cryIA(b) se detekuje za použití ELISA-testu (enzyme-linked immunosorbent assay). ELISA-testy jsou velmi citlivé, specifické testy pro antigenní materiál. ELISA-testy jsou vhodné pro stanovení exprese polypeptidových genových produktů. Anti-sérum pro tyto testy se vytvoří jako odpověď na imunizaci králíků gradientově purifikovanými krystaly Bt (Ang a kol., *Applied Environ. Microbiol.*, 36: 625 – 626 (1978)) rozpuštěnými dodecylsulfátem sodným. ELISA-testy extraktů z dočasně transformovaných buněk kukuřice se provádějí za použití standardních postupů (viz například Harlow, E., a Lane, D. v „Antibodies: A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Postupy ELISA-testu dále popsali Clark a kol., *Methods in Enzymology*, 118: 742 – 766 (1986), a Bradford, *Anal. Biochem.*, 72: 248 (1976). Tyto postupy jsou tedy odborníkovi dobře známe.

25

ELISA-testy se provádějí pro detekci tvorby proteinu CryIA(b) v protoplastech kukuřice. Množství vytvořeného proteinu je níže uváděno v ng Bt na mg celkového proteinu (ng Bt / mg). Každý konstrukt se testuje dvakrát.

30

pCIB3069 nedetekovatelné množství Bt (v obou testech),

pCIB4407 21 900 ng Bt / mg celkového proteinu,
21 000 ng Bt / mg celkového proteinu.

35

Transformované buňky kukuřice při transformaci genem Bt optimalizovaným pro kukuřici vytvářejí vysoké množství insekticidního proteinu Bt, řádově přibližně 20 000 ng proteinu Bt CryIA(b) na mg celkového rozpustného proteinu. Minimální množství detekovatelné pomocí těchto testů na bázi ELISA-testu činí přibližně 1 až 5 ng proteinu CryIA(b) na mg proteinu. Gen Bt optimalizovaný pro kukuřici tudíž způsobuje přibližně 20 000-násobný nárůst exprese tohoto proteinu v buňkách kukuřice.

40

Příklad 42

45

Test insekticidní aktivity extraktu z transformovaných protoplastů proti *Ostrinia nubilalis*

- Za použití extraktů získaných z buněk kukuřice dočasně transformovaných DNA tak, aby exprimovaly gen optimalizovaný pro kukuřici, se též provede analýza pomocí western blottingu. Při zkoumání pomocí western blottingu se zdá, že je tento protein identický s proteinem vytvářeným v *Escherichia coli*. Naproti tomu, jak je uvedeno výše v příkladu 6, buňkami kukuřice transformovanými pomocí srovnatelných vektorů s cílem dosáhnout exprese nativní kódující sekvence získané z *Bacillus thuringiensis* není produkován insekticidní protein Bt cryIA(b) v detekovatelném množství.

50

Kvalitativní testování toxicity pro hmyz lze provést za použití izolovaných protoplastů. Pro každé opakování testované ve všech biologických testech se připraví suspenze. Opakování se považuje za pozitivní, pokud způsobuje podstatně vyšší mortalitu než kontroly. Testuje se například aktivita proti hmyzu z řádu Lepidoptera za použití zavíječe kukuřičného *Ostrinia nubilalis*. 100 μ l suspenze protoplastů v 0,1% preparátu Triton X-100 se pipetuje na povrch umělé potravy pro *Agrotis ipsilon* (Bioserv, Inc., Frenchtown, NJ; F9240) v petriho miskách o rozměrech 50 mm x 10 mm. Po vysušení vzduchem se na každou desku přidá 10 neonatálních larev. Mortalita se stanovuje přibližně po 4 dnech. Tento protein, pokud ho larvy *Ostrinia nubilalis* přijímají, způsobuje 100% mortalitu.

Příklad 43

Expres syntetického Bt v protoplastech kukuřičného mesofylu

Obecný postup izolace protoplastů kukuřičného mesofylu se upraví podle postupu, který uvedli Sheen a kol., *The Plant Cell*, 2: 1027 – 1038 (1990). Systém transformace protoplastů, který použili Sheen a kol. se modifikuje tak, že se místo elektroporace použije transformace zprostředkovaná PEG (polyethylenglykolem). Tento postup, jakož i změny provedené v postupu izolace, je popsán níže.

Izolace a transformace protoplastů kukuřičného mesofylu

1. Pro získání listového materiálu se vysterylizují a nechají vyklíčit semena kukuřice. Klíčnicí rostliny se pěstují na světle při teplotě 25 °C.
2. Části listů klíčnicích rostlin starých 10 až 12 dnů se povrchově sterilizují 5% preparátem Clorox po dobu 5 minut a následně se provede několik promytí sterilní destilovanou vodou.
3. Do petriho misek o rozměrech 100 x 25 mm se dá enzymový roztok (předpis viz níže) v množství 25 ml na misku.
4. Z listů se odstraní nadbytek vody a do každé misky s enzymy se vloží 6 až 8 částí listů o velikosti zhruba 5 cm. Listový materiál přibližně ze 100 klíčnicích rostlin obvykle vystačí pro 14 misek.
5. Listy se rozetrou na co nejužší (2 až 5 mm) podélné pásy.
6. Misky se pomalu třepou při teplotě 25 °C po dobu 6,5 až 7 hodin a poté se přikryjí tak, aby inkubace probíhala ve tmě.
7. Před filtrací protoplastů se síta o velikosti otvorů 100 μ m promyjí 10 ml 0,6M mannitolu. Protoplasty se pomalu pipetují přes síta. Pro získání všech protoplastů zbylých v miskách se misky promyjí 0,6M mannitolem.
8. Přefiltrovaná kapalina se opatrně pipetuje do sterilních zkumavek o objemu 50 ml. Pro naředění se přidá stejný objem 0,6M mannitolu.
9. Provede se centrifugace po dobu 10 minut při 1000 otáčkách za minutu (500 g) v centrifuze Beckman Model TJ-6.
10. Enzymový roztok se odstraní a pelety se opatrně převedou do suspenze v 5 ml mannitolu. Suspenze vzniklá z několika pelet se spojí, objem se upraví 0,6M mannitolem na 50 ml a provede se centrifugace.

11. Vytvoří se suspenze o známém objemu (50 ml) a protoplasty se spočítají.

12. Po spočítání a vytvoření pelety se protoplasty převedou do suspenze v množství 2 miliony / ml v resuspendujícím pufru (předpis níže). Protoplasty se před transformací nechají po dobu alespoň 30 minut inkubovat v resuspendujícím pufru.

Transformace:

1. Vzorky plazmidů se dají do zkumavek (polystyrenových kultivačních uzavíratelných zkumavek o rozměrech 17 x 100 mm (Fischerbrand), pro každé ošetření se provedou alespoň tři opakování. Použijí se ekvimolární množství plazmidů tak, aby se provádělo porovnání stejného množství kopií genu.

2. Přidá se 0,5 ml protoplastů a 0,5 ml 40% PEG připraveného s 0,6M mannitolem.

3. Zkumavky se opatrně třepou kvůli míchání a inkubují se při teplotě 25 °C po dobu 30 minut.

4. Přidá se kultivační médium pro protoplasty v množstvích 1, 2 a 5 ml po 5-minutových intervalech.

5. Proveďte se centrifugace po dobu 10 minut při 1000 otáčkách za minutu (500 g).

6. Odstraní se kapalina a peleta se převede do suspenze v 1 ml kultivačního média (BMV-media).

7. Inkubace se nechá probíhat přes noc ve tmě při teplotě 25 °C.

Předpisy:

Enzymový roztok:

0,6 M mannitolu,
10 mM morfolinethansulfonové kyseliny (MES), pH 5,7,
1 mM chloridu vápenatého,
1 mM chloridu hořečnatého,
0,1 % N,O-bis(trimethylsilyl)acetamidu (BSA),
sterilizováno filtrací

k tomuto roztoku se přidají následující enzymy:

1 % enzymu Cellulase RS, a
0,1 % enzymu Macerozyme R10.

Promývací pufr:

0,6 M mannitolu,
sterilizováno filtrací.

Resuspendující pufr:

0,6 M mannitolu,
20 mM chloridu draselného,
sterilizováno filtrací.

Kultivační médium (předpis pro MBV-médium, který uvedli Okuno a kol., Phytopathology 67: 610 – 615 (1977)):

- 0,6 M mannitolu,
- 5 4 mM morfolinethansulfonové kyseliny (MES), pH 5,7,
- 0,2 mM dihydrogenfosforečnanu draselného,
- 1 mM dusičnanu draselného,
- 1 mM síranu hořečnatého,
- 10 mM chloridu vápenatého,
- 10 1X mikroživin K3,
- sterilizováno filtrací.

ELISA-testy transformovaných protoplastů se provádějí jak je popsáno výše, jeden den po transformaci. S inbrední linií kukuřice 211D se provedou následující tři pokusy. Samozřejmě lze
15 použít i jiné linie kukuřice. Použije se 50 µg plazmidu pCIB4419 a ekvimolární množství ostatních plazmidů. Celkový rozpustný protein se stanoví za použití proteinového testu BioRad (Bradford, Anal. Biochem, 72: 248 (1976)).

Transformační pokusy:

20 Testované konstrukty:

1. pCIB4419 (konstrukt obsahuje syntetický Bt pod kontrolou promotoru CaMV 35S a markerové geny 35S / PAT a 35S / GUS),
- 25 2. pCIB4420 (konstrukt obsahuje syntetický Bt pod kontrolou dřeňového promotoru a markerový gen PAT),
3. pCIB4421 (konstrukt obsahuje syntetický Bt pod kontrolou promotoru PEPC),
- 30 4. pCIB4423 (konstrukt obsahuje syntetický Bt pod kontrolou promotoru PEPC a markerový gen PAT) (PEPC : syntetický cryIA(b) : PepC intron : 35S + 35S : PAT : 35S).

35 V následujících pokusech se zkoumá produkce proteinu Bt CryIA(b) v klíčcích rostlinách 211D starých 10 až 11 dnů pomocí proteinového testu Biorad:

Pokus 1 (klíčnické rostliny staré 11 dnů):

- pCIB4419 15 000 ± 3000 ng Bt / mg proteinu,
- 40 pCIB4420 280 ± 65 ng Bt / mg proteinu,
- pCIB4421 9000 ± 800 ng Bt / mg proteinu.

Pokus 2 (klíčnické rostliny staré 10 dnů):

- 45 pCIB4419 5000 ± 270 ng Bt / mg proteinu,
- pCIB4420 80 ± 14 ng Bt / mg proteinu,
- pCIB4421 1600 ± 220 ng Bt / mg proteinu.

Pokus 3 (klíčnické rostliny staré 11 dnů):

- 50 pCIB4419 21 500 ± 1800 ng Bt / mg proteinu,
- pCIB4420 260 ± 50 ng Bt / mg proteinu,
- pCIB4421 11 900 ± 4000 ng Bt / mg proteinu,
- pCIB4423 7200 ± 3400 ng Bt / mg proteinu.

55

Výše uvedené pokusy potvrzují, že jak promotor CaMV 35S, tak PEPC exprimují syntetický protein Bt CryIA(b) ve velmi vysokém množství. Dřeňový promotor, ačkoli je méně účinný, je též efektivní při expresi syntetického proteinu CryIA(b).

5

Příklad 44

Stabilní exprese syntetického Bt v salátu

- 10 Syntetický gen Bt ve vektoru pCIB4417 pro *Agrobacterium* se transformuje do salátu *Lactuca sativa* cv. Redprize. Použitý postup transformace popsali Enomoto a kol., *Plant Cell. Reports*, 9: 6 – 9 (1990).

Postup transformace:

15

- Semena salátu se povrchově sterilizují v 5% preparátu Clorox po dobu 5 minut a následně se několikrát promyjí ve sterilní destilované vodě. Povrchově sterilizovaná semena se nanesou na polovičně koncentrované MS-médium (Murashige a Skoog, *Physiol. Plant.* 15: 473 – 497 (1962)). Jako explantáty pro infekci *Agrobacteriem* se použijí dělohy šest dnů starých klíčících rostlin salátu Redprize, pěstovaných při teplotě 25 °C při 16-hodinovém osvětlení 3000 lx. Báze a vrchol každé dělohy se odstraní skalpelem. Explantáty se namočí na 10 minut do bakteriálního roztoku, který byl kultivován po dobu 48 hodin v minimálním médiu AB s odpovídajícími antibiotiky při teplotě 28 °C. Po odsátí nadbytku bakteriálního roztoku na sterilní filtrační papír se explantáty nanesou na MS-médium (0,1 mg / l BA a 0,1 mg / l NAA) na dobu 2 dnů. Explantáty se poté přenesou na selekční médium obsahující 500 mg / l karbenicillinu a 50 mg / l kanamycinu. Explantáty se každý týden subkultivují do čerstvého média. Podmínky v růstové komoře jsou: světlo 2000 lx po dobu 16 hodin, 25 °C. Přibližně po 4 týdnech se na zdravě vypadajícím kalusu z každé ze čtyř subkultivovaných desek provedou ELISA-testy. Postup ELISA-testu je stejný jako je uveden výše pro protoplasty. Rozpustný protein se též stanoví pomocí výše popsání testu Biorad.

30

Výsledky:

- | | | |
|----|----------------------------------|---------------------------|
| 35 | pCIB3021 (kanamycinová kontrola) | 0, |
| | pCIB4417 (deska 1) | 0, |
| | pCIB4417 (deska 2) | 505 ng Bt / mg proteinu, |
| | pCIB4417 (deska 3) | 45 ng Bt / mg proteinu, |
| | pCIB4417 (deska 4) | 1200 ng Bt / mg proteinu. |

- 40 Tento příklad svědčí o tom, že dvouděložné rostliny mohou též vykazovat zvýšenou expresi optimalizovaného insekticidního genu.

Příklad 45

45

Konstrukce pCIB4429

- pCIB4429 obsahuje preferovaný kukuřičný pylově specifický promotor fúzovaný s genem cryIA(b) optimalizovaným pro kukuřici. Pylově specifický kukuřičný promotor použitý v tomto konstruktu se získá z plazmidu pKL2, který je popsán v příkladu 37. Gen cryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici se získá z plazmidu pCIB4418, který je též popsán v příkladu 37.

50

- pKL2 je plazmid, který obsahuje preferovaný kukuřičný pylově specifický promotor fúzovaný s genem beta-glukuronidázy z *Escherichia coli*. Je zkonstruován z plazmidů pSK110 a pCIB3054. pSK110 obsahuje pylově specifický kukuřičný promotor. pCIB3054, který je

55

derivátem pUC19, obsahuje gen beta-glukuronidázy (GUS) z *Escherichia coli* fúzovaný s promotorem 35S z viru mozaiky kvěťáku (CaMV). Jeho konstrukce je popsána kdekoli v popisu. Tento promotor lze odstranit z uvedeného plazmidu pomocí rozštěpení Sall a Hind III, čímž se získá fragment obsahující gen GUS, bakteriální gen rezistence vůči ampicillinu a počátek replikace ColEI. Druhý fragment obsahuje promotor CaMV 35S.

pCIB3054 se štěpí restrikcími enzymy Sall a HindIII, za použití standardních podmínek, po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Reakční směs se poté extrahuje fenolem a chloroformem za použití standardních podmínek a DNA se izoluje pomocí vysrážení ethanolem za použití standardních postupů. Izolovaná DNA se převede do suspenze v pufru vhodném pro reakci s alkalickou fosfatázou ze střeva telat (CIP) a nechá se reagovat přes noc s 2,5 jednotkami CIP při teplotě 37 °C. Po reakci s CIP se DNA purifikuje na agarózovém gelu za použití standardních podmínek popsaných kdekoli v popisu. pSK110 se štěpí Sall a Hind III za standardních podmínek po dobu 2 hodin při teplotě místnosti a DNA se následně purifikuje na agarózovém gelu za použití standardních podmínek. Izolované fragmenty DNA se ligují za použití standardních podmínek po dobu 2 hodin při teplotě místnosti a následně se pomocí standardních postupů transformují do kompetentních buněk *Escherichia coli* kmene HB101. Selektce transformantů se provede na L-agaru obsahujícím 100 µg ampicillinu / ml. Za použití standardních postupů miniscreeningu plazmidů se charakterizují transformanty obsahující požadovaný plazmidový konstrukt. Správný konstrukt se označí pKL2.

Pro vytvoření pCIB4429 se provede ligace tří částí za použití standardních podmínek známých v oboru. Třemi ligovanými fragmenty jsou:

- 1) fragment HindIII / BamHI z pCIB4418, o velikosti přibližně 4,7 kb, který obsahuje gen cryIA(b), bakteriální gen rezistence vůči ampicillinu, a počátek replikace ColEI,
- 2) fragment HindIII / XbaI z pKL2, o velikosti přibližně 1,3 kb, který obsahuje pylově specifický promotor z kukuřice,
- 3) fragment vytvořený pomocí polymerázové řetězové reakce odvozený od pylového promotoru s místem BamHI zavedeným downstream od místa počátku transkripce. Tento fragment má velikost přibližně 120 bp a jeho konce jsou rozštěpeny restrikcími enzymy XbaI a BamHI.

Fragment vytvořený pomocí polymerázové řetězové reakce se získá za použití reakční směsi o objemu 100 µl a standardních podmínek popsaných výše. Použité primery jsou:

SK50: 5' -CCC TTC AAA ATC TAG AAA CCT-3'

KE127: 5' -GCG GAT CCG GCT GCG GCG GGG AAC GA-3'

Výše uvedené primery se smíchají v reakční směsi pro polymerázovou řetězovou reakci s plazmidem pSK105, přičemž tento plazmid obsahuje pylově specifický promotor z kukuřice.

Po dokončení polymerázové řetězové reakce se 10 µl reakční směsi analyzuje za použití standardních podmínek na agarózovém gelu, kvůli ujištění, že se reakcí vytvořil produkt o očekávané velikosti.

Zbylých 90 µl se ošetří proteinázou K v konečné koncentraci 50 µg / ml po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Reakční směs se poté zahřívá na 65 °C po dobu 10 minut, a extrahuje se fenolem a chloroformem za použití standardních postupů. DNA se ze supernatantu izoluje vysrážením dvojnásobným objemem ethanolu za použití standardních podmínek. Po vysrážení se DNA oddělí centrifugací v mikrocetrifúze. Peleta se jednou promyje 70% ethanolem (což je

standardní v oboru), rychle se vysuší kvůli odstranění veškerého ethanolu a převede se do suspenze v 17 µl TE-pufu. Přidají se 2 µl 10X pufru pro restrikční enzymy a též 0,5 µl BamHI a 0,5 µl XbaI. DNA se štěpí po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C, čímž se získá fragment DNA rozštěpený XbaI a BamHI. Po rozštěpení restrikčními enzymy se tento fragment purifikuje na agarózovém gelu tvořeném 2% NuSieve (FMC) / 1% agarózovým gelem. K vymytí DNA z agarózy se použijí filtrační jednotky Millipore podle pokynů výrobce. Po eluci se DNA použije k výše popsané ligaci tří částí.

Po ligaci se DNA transformuje za použití standardních postupů do kompetentních buněk *Escherichia coli* kmene HB101. Selektce transformantů se provede na deskách L-agaru obsahujících ampicillin v množství 100 µg / ml. Kolonie rostoucí za selekčních podmínek se charakterizují za použití postupů standardních v oboru podle plazmidových inzertů.

15 Příklad 46

Konstrukce pCIB4431, vektoru pro tkáňově specifickou expresi syntetického genu cryIA(b) v rostlinách

20 pCIB4431 je vektor vytvořený pro transformaci kukuřice. Obsahuje dva chimérické geny endotoxinu Bt exprimovatelné v kukuřici. Těmito geny jsou promotor fosfoenolpyruvát-karboxylázy / syntetický cryIA(b) a pylový promotor / syntetický cryIA(b). Gen PEPC / cryIA(b) v tomto vektoru se získá z výše popsaného pCIB4421. Pylový promotor je též popsán výše. Obrázek 20 představuje mapu plazmidu pCIB4431. pCIB4431 se zkonstruuje pomocí ligace tří částí za 25 použití fragmentu Kpn I / Hind III o velikosti přibližně 3,5 kb (obsahujícího pylový promotor / syntetický cryIA(b)) z pCIB4429, fragment Hind III / Eco RI o velikosti přibližně 4,5 kb (PEPC / syntetický cryIA(b)) a fragment Kpn I / Eco RI o velikosti přibližně 2,6 kb z vektoru Bluescript.

30 Mezi další vektory obsahující chimérický gen pylový promotor / syntetický CryIA(b) patří pCIB4428 a pCIB4430, viz obrázky 21 a 22. pCIB4430 též obsahuje výše popsaný gen PEPC / syntetický Bt.

35 Příklad 47

vytvoření transgenických rostlin kukuřice obsahujících syntetický gen CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici

40 Níže popsaný příklad používá zařízení Biolistics pro zavedení částic obalených DNA do buněk kukuřice, ze kterých se vytvoří transformované rostliny.

Pokus KC-65

45 Tvorba transgenických rostlin kukuřice exprimujících syntetický gen cryIA(b) za použití tkáňově specifického promotoru

Tkáň

50 Z palice genotypu 6N615 se 14 – 15 dnů pro opylení vyříznou nezralá embrya kukuřice, dlouhá přibližně 1,5 až 2,5 mm. Mateřská rostlina se pěstuje ve skleníku. Před vyříznutím se palice povrchově sterilizuje 20% preparátem Clorox po dobu 20 minut a třikrát promyje sterilní vodou. Jednotlivá embrya se umístí štítkovou stranou na plochu 2 cm², v množství 36 embryí na desku, na médium iniciující tvorbu kalusu, médium 2DG4 + 5 chloramben (hlavní soli N6, vedlejší soli B5, MS-železo, 2 % sacharózy, s 5 mg / 1 chlorambenu, 20 mg / 1 glukózy, a 10 ml přísad G4 55 (tabulka 1) přidanými po autoklávování).

Tabulka 1

Přísady G4

5

složka	množství na litr média
hydrolyzát kaseinu	0,5 mg
prolin	1,38 mg
kyselina nikotinová	0,2 mg
pyridoxin-HCl	0,2 mg
thiamin-HCl	0,5 mg
cholin-HCl	0,1 mg
riboflavin	0,05 mg
biotin	0,1 mg
kyselina listová	0,05 mg
kalcium-pantothenát	0,1 mg
kyselina p-aminobenzoová	0,05 mg
B12	0,136 µg

Bombardování

10 Tkáň se bombarduje za použití zařízení PDS-1000He Biolistics. Tkáň se umístí 8 cm pod desku se stínítkem (stopping screen). Na tkáň se jednou vystřelí roztokem DNA a zlata jako mikronosiče, kdy je 10 µl vysušeno na makronosiči. Použité stínítko (stopping screen) se ručně přenesse na ABRU za použití síťové mřížky z nerezavějící oceli (10 x 10). Použijí se disky (rupture discs) o hodnotě 1550 psi. Po bombardování se embrya kultivují ve tmě při teplotě 25 °C.

15 Příprava DNA pro bombardování

20 Mikronosič se připraví v podstatě podle pokynů dodávaných se zařízením Biolistic. K 50 µl zlata jako mikronosiče (o velikosti částic 1,0 µm) se za míchání přidá 5 µl pCIB4431 (1,23 µg / µl) (č.898) spolu s 2 µl pCIB3064 (0,895 µg / µl) (č.456), následně 50 µl 2,5M chloridu vápenatého a poté 20 µl 0,1M spermidinu (ve formě technicky čisté volné báze). Výsledná směs se míchá po dobu 3 minut a mikrocentrifuguje po dobu 10 sekund. Supernatant se odstraní a mikronosiče se promyjí dvakrát 250 µl 100% ethanolu (vhodného pro kapalinovou chromatografii s vysokou rozlišovací schopností) tak, že se směs rychle promíchá, centrifuguje a supernatant se odstraní. Mikronosiče se převedou do suspenze v 65 µl 100% ethanolu.

25

Tvorba kalusu

30 Embrya se přenesou 1 den po bombardování do média iniciujícího tvorbu kalusu s 3 mg / 1 PPT. U embryí se zjišťuje iniciace tvorby kalusu 2 a 3 týdny po bombardování. Pokud dojde k jakékoli odpovědi, provede se přenos do média pro udržování kalusu, média 2DG4 + 0,5 2,4-D s 3 mg / 1 PPT. Médium pro udržování kalusu tvoří hlavní soli N6, vedlejší soli B5, MS-železo, 2 % sacharózy, s 0,5 mg / 1 2,4-D (2,3-dichlorfenoxycetové kyseliny), 20 mg / 1 glukózy a 10 ml přísad G4 přidanými po autoklávování. Embryogenní kalus se subkultivuje každé 2 týdny do čerstvého média pro udržování kalusu obsahujícího 3 mg / 1 PPT. Všechny kalusy se inkubují ve tmě při teplotě 25 °C.

35

Formace kalusu typu I činí 15 %. Každé embryo, které vytvoří kalus, se kultivuje jako samostatný případ, a dá vzniknout samostatné linii.

Regenerace

Po 12 týdnech selekce se tkáň vyjme z média pro udržování kalusu s PPT a umístí do regeneračního média. Regeneračním médiem je 0,25MS3S5BA (0,25 mg / l 2,4-D, 5 mg / l BAP, MS-soli, 3 % sacharózy), na kterém regenerace probíhá po dobu 2 týdnů, a následuje subkultivace do média MS3S pro regeneraci rostlin. Po 4 až 10 týdnech se rostliny vyjmou a umístí do nádob GA7. Z naší linie KC65 0 – 6, která se stala případem č. 176 BT, bylo vytvořeno celkem 38 rostlin.

10 Testy

U všech rostlin, poté co se ujmou v nádobách GA7, se testuje pomocí testu s chlorfenolovou červení (CR) jejich rezistence vůči PPT, jak je popsáno v americké přihlášce vynálezu 07/759 243, podané 13. září 1991. Tento test využívá indikátorové barvivo citlivé na pH ke stanovení, které buňky rostou v přítomnosti PPT. Buňky, které rostou, způsobují změnu pH média, a barva indikátoru se změní z červené na žlutou. Tímto testem lze snadno určit rostliny exprimující gen rezistence vůči PPT (u č.176: 8 pozitivních a 30 negativních). U rostlin pozitivních v testu s chlorfenolovou červení se pomocí polymerázové řetězové reakce testuje přítomnost syntetického genu Bt (u č.176: 5 pozitivních, 2 negativní, 1 mrtvá).

Rostliny pozitivní při vyhledávání syntetického genu Bt pomocí polymerázové řetězové reakce se pošlou do fytotronu. Jakmile se rostliny ujmou ve fytotronu, charakterizují se za použití biologických testů s hmyzem a ELISA–testu. Biologické testy s hmyzem se u rostlin provádějí za použití standardního testu s *Ostrinia nubilalis* (popsaného v příkladu 5A), při kterém se z rostliny odstříhnou malé části listů a umístí v malé petriho misce s určitým počtem neonatálních larev *Ostrinia nubilalis*. Obvykle se rostliny testují ve výšce přibližně 15 cm. Rostliny, které vykazují v tomto testu 100% mortalitu pro *Ostrinia nubilalis*, se dále charakterizují. Údaje získané pomocí ELISA–testu jsou uvedeny níže. Pozitivní rostliny se přenesou do skleníku.

30 Fertilita ve skleníku

Rostlina č.176–11 se opylí pylem divokého typu 6N615. Vytvoření se jedna palice z vlákniny a jedna výhonková palice. Vyjme se všech 11 embryí z palice z vlákniny a 56 zrn z palice 1. 294 zrn zůstane na palici a uschne přirozeným způsobem.

Pyl z č.176–11 se zkříží s různými genotypy kukuřice 5N984, 5NA89 a 3N961. U všech tří křížení se vyjmou embrya (5N984: 45, 5NA89: 30, 3N961: 8). Většina zrn zůstane na palicích na rostlinách ve skleníku a uschne přirozeným způsobem. Z rostliny č.176–11 se za použití standardních postupů izoluje DNA, která se analyzuje pomocí Southern blottingu. Zjistí se, že obsahuje sekvence, které hybridizují se sondami získanými ze syntetického genu *cryIA(b)* a se sondou získanou z genu PAT. Tyto výsledky dokazují integraci těchto genů do genomu kukuřice.

45 Pokus KC–64

Tvorba transgenických rostlin kukuřice exprimujících syntetický gen *cryIA(b)* za použití konstitutivního promotoru

50 Tkáň

Z palice genotypu 6N615 se 14 – 15 dnů po opylení vyříznou nezralá embrya kukuřice, dlouhá přibližně 1,5 až 2,5 mm. Mateřská rostlina se pěstuje ve skleníku. Před vyříznutím se palice povrchově sterilizuje 20% preparátem Clorox po dobu 20 minut a třikrát promyje sterilní vodou. Jednotlivá embrya se umístí štítkovou stranou na plochu 2 cm², v množství 36 embryí na desku, na médium iniciující tvorbu kalusu, médium 2DG4 + 5 chloramben (hlavní soli N6, vedlejší soli

B5, MS–železo, 2 % sacharózy, s 5 mg / l chlorambenu, 20 mg / l glukózy, a 10 ml přísad G4 (tabulka 1) přidanými po autoklávování).

5 Tabulka 1

Přísady G4

složka	množství na litr média
hydrolyzát kaseinu	0,5 mg
prolin	1,38 mg
kyselina nikotinová	0,2 mg
pyridoxin–HCl	0,2 mg
thiamin–HCl	0,5 mg
cholin–HCl	0,1 mg
riboflavin	0,05 mg
biotin	0,1 mg
kyselina listová	0,05 mg
kalcium–pantothenát	0,1 mg
kyselina	0,05 mg
B12	0,136 µg

10 Bombardování

Tkáň se bombarduje za použití zařízení PDS–1000He Biolistics. Tkáň se umístí 8 cm pod desku se stínítkem (stopping screen). Na tkáň se jednou vystřelí roztokem DNA a zlata jako mikronosiče, kdy je 10 µl vysušeno na makronosiči. Použité stínítko (stopping screen) se ručně přenesou na ABRU za použití síťové mřížky z nerezavějící oceli (10 x 10). Použijí se disky (rupture discs) o hodnotě 1550 psi. Po bombardování se embrya kultivují ve tmě při teplotě 25 °C.

Příprava DNA pro bombardování

Mikronosič se připraví v podstatě podle pokynů dodávaných se zařízením Biolistic. K 50 µl zlata jako mikronosiče (o velikosti částic 1,0 µm) se za míchání přidá 3,2 µl pCIB4418 (0,85 µg / ml) (č.905) spolu s 2 µl pCIB3064 (0,895 µg / µl) (č.456) a 1,6 µl pCIB3007A (1,7 µg / µl) (č.152), následně 50 µl 2,5M chloridu vápenatého a poté 20 µl 0,1M spermidinu (ve formě technicky čisté volné báze). Výsledná směs se míchá po dobu 3 minut a mikrocentrifuguje po dobu 10 sekund. Supernatant se odstraní a mikronosiče se promyjí dvakrát 250 µl 100% ethanolu (vhodného pro kapalinovou chromatografii s vysokou rozlišovací schopností) tak, že se směs rychle promíchá, centrifuguje a supernatant se odstraní. Mikronosiče se převedou do suspenze v 65 µl 100% ethanolu.

30 Tvorba kalusu

Embrya se přenesou 1 den po bombardování do média iniciujícího tvorbu kalusu s 3 mg / l PPT. U embryí se zjišťuje iniciace tvorby kalusu 2 a 3 týdny po bombardování. Pokud dojde k jakékoli odpovědi, provede se přenos do média pro udržování kalusu, média 2DG4 + 0,5 2,4–D s 3 mg / l PPT. Médium pro udržování kalusu tvoří hlavní soli N6, vedlejší soli B5, MS–železo, 2 % sacharózy, s 0,5 mg / l 2,4–D (2,4–dichlorfenoxyoctové kyseliny), 20 mg / l glukózy a 10 ml přísad G4 přidanými po autoklávování. Embryogenní kalus se subkultivuje každé 2 týdny do čerstvého média pro udržování kalusu obsahujícího 3 mg / l PPT. Všechny kalusy se inkubují ve tmě při teplotě 25 °C.

Formace kalusu typu I činí 18 %. Každé embryo, které vytvoří kalus, se kultivuje jako samostatný případ, a dá vzniknout samostatné linii.

Regenerace

5

Po 12 týdnech selekce se tkáň vyjme z média pro udržování kalusu s PPT, umístí do regeneračního média a inkubuje se při teplotě 25 °C za použití fotoperiody 16 hodin světla ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a 8 hodin tmy. Regeneračním médiem je 0,25MS3S5BA (0,25 mg / l 2,4-D, 5 mg / l BAP, MS-soli, 3 % sacharózy), na kterém regenerace probíhá po dobu 2 týdnů, a následuje subkultivace do média MS3S pro regeneraci rostlin. Po 4 až 10 týdnech se rostliny vyjmou a umístí do nádob GA 7. Z naší linie KC64 0 – 1, která se stala případem č.170 BT, bylo vytvořeno 55 rostlin. Z naší linie KC64 0 – 7, která se stala případem č.171 BT, bylo vytvořeno celkem 33 rostlin.

15 Testy

U 11 rostlin, poté co se ujmou v nádobách GA7, se testuje pomocí testu s chlorfenolovou červení (CR) jejich rezistence vůči PPT, jak popsali Shillito a kol., viz výše. Tento test využívá indikátorové barvivo citlivé na pH ke stanovení, které buňky rostou v přítomnosti PPT. Buňky, které rostou, způsobují změnu pH média, a barva indikátoru se změní z červené na žlutou. Tímto testem lze snadno určit rostliny exprimující gen rezistence vůči PPT. U rostlin pozitivních v testu s chlorfenolovou červení se pomocí polymerázové řetězové reakce testuje přítomnost syntetického genu Bt (u případu 170: 37 pozitivních, 18 negativních, u č.171: 25 pozitivních, 8 negativních).

25

Rostliny pozitivní při vyhledávání syntetického genu Bt pomocí polymerázové řetězové reakce se pošlou do fytostronu. Jakmile se rostliny ujmou ve fytostronu, charakterizují se za použití biologických testů s hmyzem a ELISA–testu. Biologické testy s hmyzem se u rostlin provádějí za použití standardního testu s *Ostrinia nubilalis* (viz níže), při kterém se z rostliny odstříhnou malé části listů a umístí v malé petriho misce s určitým počtem neonatálních larev *Ostrinia nubilalis*. Obvykle se rostliny testují ve výšce přibližně 15 cm. Rostliny, které vykazují v tomto testu 100% mortalitu pro *Ostrinia nubilalis*, se dále charakterizují. Údaje získané pomocí ELISA–testu jsou uvedeny níže. Pozitivní rostliny se přenesou do skleníku.

35 Testování pomocí herbicidu Basta

Pro zhodnocení rezistence vůči herbicidu Basta (Hoechst) se vybere osm zralých rostlin č.170. Na každé rostlině se na jednom listu ze středu rostliny plocha o délce 10 až 14 cm a šířce listu natře 0, 0,4, 1,0 nebo 2,0% (10 ml roztoku obsahujícího 200 g / l naředěných na 100 ml deionizovanou vodou) vodným roztokem Basta obsahujícím 2 kapky povrchově aktivního činidla Tween 20 / 100 ml. Pro každou koncentraci se použijí dvě testované rostliny. Jako kontroly se ošetří osm rostlin divokého typu 6N615 přibližně stejného stáří. Všechny rostliny se pozorují po 4 a 7 dnech. Všechny kontrolní rostliny nakonec odumřou. Během zkoumání nevykazuje žádná z rostlin č.170 jakékoli poškození vlivem herbicidu.

45

Opylení

Všechny palice z vlákniny, první palice, a, pokud se vyskytují, druhé palice na rostlinách č.170 a č.171 se opylí pylem divokého typu 6N615. Nejméně 90 % rostlin je fertilních, pokud se jedná o samičí fertilitu.

50

Pyel rostlin č.171 se zkříží s genotypy 6N615, 5N984, 5NA89, 6F010, 5NA56, 2N217AF, 2NDO1 a 3N961. Nejméně 90 % rostlin je fertilních, pokud se jedná o samčí fertilitu.

Vyjmutí embryí

Embrya z rostlin č. 171 se „vyjmou“. Čtrnáct až šestnáct dnů po opylení se vrchol palice s 25 až 50 zrny odřízne lupenkovou pilkou od palice. Před odříznutím se opatrně oloupají listové pochvy, aby se odkryla vrchní část palice. Uříznutý konec palice na rostlině se natře fungicidem Captan a listové pochvy se vrátí na původní místo. Semena, která zůstanou na rostlině, se nechají uschnout přirozeným způsobem.

Odříznutá část palice se povrchově sterilizuje 20% preparátem Clorox po dobu 20 minut a promyje třikrát sterilní vodou. Jednotlivá embrya se vyříznou a umístí štítkovou stranou nahoru na médium B5 (Gamborg) obsahující 2 % sacharózy. B5-vitamíny se přidají k médiu po autoklávování. Do každé nádoby GA7 se umístí čtyři embrya a nádoby se inkubují ve tmě. Když dojde ke klíčení, přenesou se nádoby do světlé kultivační místnosti a inkubují se při teplotě 25 °C za použití fotoperiody 16 hodin světla ($50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a 8 hodin tmy. Klíčivost činí 94 %.

Potomstvo 15 rostlin č.171 a 2 rostlin č.176 se získá za použití standardních postupů vyjmutí embryí a provede se jeho zhodnocení. U všech rostlin se provede test na hmyzu. Rostliny z č.171 se též testují pomocí histochemického GUS-testu. Jak v testu na hmyzu, tak v GUS-testu je poměr segregace transgenů 1 : 1, jak se očekává v případě inserce jediného lokusu.

Příklad 48

Analýza transgenických rostlin kukuřice ELISA-test

Expresí genu *cryIA(b)* v transgenické kukuřici se monitoruje pomocí biologického testu na hmyzu za použití *Ostrinia nubilalis* a ELISA-testu pro kvantitativní stanovení množství získaného proteinu *cryIA(b)*. Kvantitativní stanovení insekticidního proteinu *cryIA(b)* v listech transgenických rostlin se provede za použití ELISA-testů (enzyme-linked immunosorbant assays), jak popsali Clark M. F., Lister R. M., Bar-Joseph M.: ELISA Techniques. v: Weissbach A., Weissbach H. (eds.) Methods in Enzymology 118: 742 – 766, Academic Press, Florida 1986). Pro stanovení ng insekticidního proteinu na mg rozpustného proteinu ze surových extraktů ze vzorků listů se použijí imunoafinitně purifikované polyklonální králičí a kozí protilátky specifické pro insekticidní proteiny *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Citlivost ELISA-testu typu dvojitého sandwich (double sandwich ELISA) činí 1–5 ng insekticidního proteinu na mg rozpustného proteinu za použití 50 µg celkového proteinu na jamku mikrotitrační desky pro ELISA-test.

Extrakty z kukuřice se připraví rozmělněním listové tkáně v plastových sáčkách vyložených gázou za použití ručního homogenizátoru s kuličkami (AGDIA, Elkart, Indiana) za přítomnosti extrakčního pufru (50 mM uhličitanu sodného, pH 9,5, 100 mM chloridu sodného, 0,05 % preparátu Triton, 0,05 % povrchově aktivního činidla Tween, 1 mM PMSF a 1 µM leupeptinu). Stanovení proteinů se provede za použití proteinového testu Bio-Rad (Richmond, Kalifornie).

Za použití výše uvedeného postupu se analyzuje za použití ELISA-testu přítomnost proteinu *cryIA(b)* ve výše popsaných primárních transformantech kukuřice. Výška těchto rostlin v době analýzy kolísá od přibližně 15 cm do přibližně 90 cm.

Rostlina	ng Bt / mg rozpustného proteinu	5/27/91
176-8	0	0
176-10	700	1585
176-11	760	2195
171-4A	59	
171-6	50	
171-8	60	
171-9	280	
171-13	77	
171-14A	43	
171-14B	60	
171-15	55	
171-16A	13	
171-16B	19	
171-18	19	
176-30	1160	
171-32	980	
171-31	166	
171-30	370	
71-14		
list č. 10	26	
list č. 1	17	
rostlina 171-16		
list č. 9	40	
list č. 1	120	

Test s *Ostrinia nubilalis*

- 5 1. Z rozvinutého listu rostliny kukuřice se nařežou 1 až 4 části o velikosti 4 cm.
2. Každá část listu se umístí na navlhčený list filtračního papíru v petriho misce o rozměrech 50 x 9 mm.
- 10 3. Na každou část listu se umístí pět neonatálních larev *Ostrinia nubilalis* (což odpovídá celkem 5 až 20 larvám na rostlinu).
4. Petriho misky se inkubují při teplotě 29,5 °C.
- 15 5. Údaje o poškození listů požerem a mortalitě se zjišťují po 24, 48 a 72 hodinách.

Příklad 49

- 20 Expres endotoxinu Bt v potomstvu transformovaných rostlin kukuřice

Transformované rostliny kukuřice jsou plně fertlní a zkříží se s několika genotypy kukuřice. U potomstev z těchto křížení se analyzuje jejich schopnost usmrtit *Ostrinia nubilalis* ve standardním biologickém testu s *Ostrinia nubilalis* (popsaném bezprostředně výše), jakož i přítomnost proteinu cryIA(b) za použití ELISA-testu, jak je popsáno výše. Schopnost usmrtit *Ostrinia nubilalis* a produkce proteinu cryIA(b) je v korelaci. Segregace těchto znaků u potomstva je v poměru 1 : 1, což svědčí o inzerci aktivní kopie syntetického genu do jediného místa. Tento poměr 1 : 1 platí jak pro rostliny obsahující konstitutivní promotor / syntetický cryIA(b), tak pro rostliny obsahující tkáňově specifický promotor / syntetický cryIA(b) (údaje nejsou uvedeny).

Na obrázku 23A je tabulka obsahující malou část z celkového počtu analyzovaného potomstva. Tato tabulka je reprezentativní pro řadu odlišných křížení.

- 5 Za použití listového materiálu (jak je popsáno výše) z transgenického potomstva obsahujícího gen CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici se provedou testy na hmyzu za použití *Diatraea saccharalis* a *Ostrinia nubilalis*. Výsledky těchto testů jsou uvedeny na obrázku 23B, a svědčí o tom, že gen CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici poskytuje transformovaným rostlinám rezistenci vůči *Diatraea saccharalis* a *Ostrinia nubilalis*.

10

Příklad 50

Expresí genu cryIA(b) v pylu kukuřice

15

Potomstvo transformovaných rostlin kukuřice obsahujících gen pylový promotor / syntetický cryIA(b) získaný z pCIB4431 se pěstuje v polních podmínkách do dosažení zralosti. Pyl se izoluje a analyzuje se na přítomnost proteinu cryIA(b) za použití standardních ELISA-testů, jak jsou popsány na libovolném místě. V pylu se detekují vysoké koncentrace proteinu cryIA(b).

20

Potomstvo rostlin transformovaných genem promotor 35S / syntetický cryIA(b) se pěstuje ve skleníku. Pyl z těchto rostlin se analyzuje za použití ELISA-testu a detekuje se protein cryIA(b).

25

Výsledky jsou uvedeny níže na obrázku 23C. Expresi mohou ovlivnit též různé faktory včetně výběru linií rostlin, rostlinných genotypů, syntetických sekvencí a podobně.

Příklad 51

30

Expresí genu cryIA(b) fúzaného s dřeňově preferovaným promotorem

pCIB4433 (obrázek 36) je plazmid obsahující gen CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici fúzaný s dřeňově preferovaným promotorem izolovaným z kukuřice. Tento plazmid se zkonstruuje pomocí ligace tří částí za použití:

35

- 1) fragmentu o velikosti 1,8 kb z pCIB4418 rozštěpeného BstEII a BamHI,
- 2) fragmentu o velikosti 5,9 kb z pBt1b1 rozštěpeného NsiI a BstEII, pBt1b1 je popsán kdekoli v popisu,
- 3) fragmentu vytvořeného pomocí polymerázové řetězové reakce VI-151, který se získá polymerázovou řetězovou reakcí za použití standardních podmínek uvedených kdekoli v popisu.

40

Použitými primery pro polymerázovou řetězovou reakci jsou:

KE150A28: 5' -ATT CGC ATG CAT GTT TCA TTA TC-3'

KE151A28: 5' -GCT GGT ACC ACG GAT CCG TCG CTT CTG TGC AAC AAC
C-3'

45

Po polymerázové řetězové reakci se DNA zkontroluje na agarózovém gelu kvůli ujištění, že reakce proběhla správně. DNA se izoluje z reakční směsi pro polymerázovou řetězovou reakci za použití standardních podmínek popsanych na libovolném místě a následně se rozštěpí restrikcími enzymy NsiI a BamHI za použití standardních postupů. Po rozštěpení se fragmenty

rozdělí na 2% NuSieve-gelu a požadovaný pás se izoluje, jak je popsáno na libovolném místě. DNA se použije ve výše popsané ligaci.

Po ligaci (za standardních podmínek) se DNA transformuje do kompetentní buňky *Escherichia coli*.

Transformace se provádí za použití metody bombardování mikroprojektily, v podstatě jak je popsáno kdekoli v popisu. Embrya se přenesou 24 hodin po bombardování mikroprojektily do média obsahujícího PPT v množství 10 µg / ml. Výsledný kalus se po čtyřech týdnech přenesou do média obsahujícího PPT v množství 40 µg / ml. Rostliny se regenerují bez selekce.

Malý vzorek rostlin (3 až 5) pro každý případ se testuje pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). K vyjádření odlišných poloh a vzdáleností embryí vzhledem k zařízení pro bombardování mikroprojektily se přidá další označení. Rostliny se následujícími označeními se dají do skleníku:

JS21A TOP rostliny B.t. PCR–pozitivní
 JS21A MID rostliny B.t. PCR–pozitivní
 JS21C BOT rostliny B.t. PCR–pozitivní
 JS22D MID rostliny B.t. PCR–pozitivní
 JS23B MID rostliny B.t. PCR–negativní (kontrola)

U vzorků listů z regenerovaných rostlin se testuje v biologickém testu insekticidní aktivita proti *Ostrinia nubilalis*, jak je popsáno v příkladu 48. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 23D.

Pro kvantifikaci množství proteinu CryIA(b) exprimovaného v listech se provede ELISA–test vzorků listů, jak je popsán v příkladu 48. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 24E.

Uložení plazmidů

Podle Budapešťské úmluvy byly ve sbírce kultur Agricultural Research Culture Collection (NRRL) (1818 N. University St., Peoria, IL 61604) uloženy následující plazmidy: pCIB4418, pCIB4420, pCIB4429, pCIB4431, pCIB4433, pCIB5601, pCIB3166 a pCIB3171.

Vynález byl popsán na příkladech jeho specifických provedení, je však třeba vzít v úvahu, že umožňuje řadu variací, modifikací a jiných provedení. V souladu s tím je třeba brát v úvahu, že všechny takové variace, modifikace a provedení jsou v duchu vynálezu a spadají do jeho rozsahu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Nukleotidová sekvence obsahující kódující sekvenci, která kóduje protein z *Bacillus thuringiensis* schopný usmrtit hmyz, přičemž tato kódující sekvence vykazuje alespoň 90% homologii s kódující sekvencí obsahující 100 % kukuřičí preferovaných kodónových sekvencí pro tento protein.

2. Nukleotidová sekvence podle nároku 1, kde uvedená kódující sekvence kóduje protein z *Bacillus thuringiensis*.

3. Nukleotidová sekvence podle nároku 2, kde uvedená kódující sekvence kóduje protein CryIA(b).

4. Nukleotidová sekvence podle nároku 3, kde uvedená kódující sekvence obsahuje sekvenci 3, sekvenci 4, nebo sekvenci znázorněnou na obrázku 7.

5. Nukleotidová sekvence podle nároku 3, kde kódující sekvence kóduje protein CryIA(b), který je ve srovnání s nativním proteinem CryIA(b) tepelně stabilní.
- 5 6. Nukleotidová sekvence podle nároku 5, kde uvedená kódující sekvence obsahuje sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvence znázorněné na obrázku 9, obrázku 11, obrázku 13 a obrázku 15.
7. Nukleotidová sekvence podle nároku 2, kde uvedená kódující sekvence kóduje protein
10 CryIB nebo CryIA(c).
8. Nukleotidová sekvence podle nároku 7, kde uvedená kódující sekvence obsahuje sekvenci, která kóduje protein CryIB, znázorněnou na obrázku 6.
- 15 9. Nukleotidová sekvence podle libovolného z nároků 1 až 8, která dále obsahuje první promotor schopný řídit expresi nukleotidové sekvence v rostlinné buňce, operabilně spojený s uvedenou kódující sekvencí.
- 10 10. Nukleotidová sekvence podle nároku 9, kde uvedený promotor je schopen řídit expresi připojené kódující sekvence v buňce kukuřice.
- 25 11. Nukleotidová sekvence podle nároků 9 nebo 10, kde uvedený promotor je vybrán ze skupiny zahrnující indukovatelné promotory, konstitutivní promotory, časově nebo vývojově regulované promotory, tkáňově preferované a tkáňově specifické promotory.
- 30 12. Nukleotidová sekvence podle nároku 11, kde uvedený promotor je vybrán ze skupiny zahrnující promotor CaMV 35S, promotor CaMV 19S, promotor fosfoenolpyruvát–karboxylázy, dřevňově preferovaný promotor a pylově specifický promotor.
- 35 13. Nukleotidová sekvence podle nároku 12, kde uvedený promotor je schopen v rostlině řídit pylově specifickou expresi připojeného strukturního genu, přičemž tento promotor je izolován z rostlinného genu kalcium–dependentní fosfát–kinázy, tedy CDPK.
- 40 14. Nukleotidová sekvence podle nároku 12, kde uvedený promotor je schopen v rostlině řídit dřevňově preferovanou expresi připojeného strukturního genu, přičemž tento promotor je izolován z rostlinného genu alfa podjednotky tryptofan–syntázy, tedy TrpA.
- 45 15. Nukleotidová sekvence podle libovolného z nároků 13 nebo 14, kde uvedený promotor je izolován z jednoděložné rostliny.
16. Nukleotidová sekvence podle nároku 15, kde uvedený promotor je izolován z rostliny kukuřice.
17. Nukleotidová sekvence podle nároku 14, kde uvedeným promotorem je dřevňově preferovaný promotor obsahující sekvenci DNA znázorněnou na obrázku 24.
18. Nukleotidová sekvence podle nároku 13, kde uvedeným promotorem je pylově specifický promotor obsahující sekvenci DNA znázorněnou na obrázku 35.
- 50 19. Nukleotidová sekvence podle nároku 9, která dále obsahuje druhý promotor schopný řídit expresi připojené kódující sekvence v rostlinné buňce, operativně spojený s druhou kódující sekvencí.
- 55 20. Nukleotidová sekvence podle nároku 19, kde uvedený druhý promotor je promotor uvedený v libovolném z nároků 10 až 18.

21. Nukleotidová sekvence podle nároku 19, kde uvedená druhá kódující sekvence kóduje protein schopný usmrtit hmyz a vykazuje alespoň 90% homologii s kódující sekvencí obsahující 100 % kukuřičí preferovaných kodónových sekvencí pro tento protein.
- 5 22. Nukleotidová sekvence podle nároku 21, kde uvedená druhá kódující sekvence kóduje protein z *Bacillus thuringiensis*.
- 10 23. Nukleotidová sekvence podle nároku 22, kde uvedená druhá kódující sekvence kóduje protein CryIA(b).
24. Nukleotidová sekvence podle nároku 19, kde uvedenou druhou kódující sekvencí je markervý gen.
- 15 25. Rekombinantní vektor, který obsahuje nukleotidovou sekvenci podle libovolného z nároků 1 až 18.
26. Rekombinantní vektor, který obsahuje nukleotidovou sekvenci podle libovolného z nároků 19 až 24.
- 20 27. Rostlina stabilně transformovaná nukleotidovou sekvencí podle libovolného z nároků 1 až 18.
28. Rostlina stabilně transformovaná nukleotidovou sekvencí podle libovolného z nároků 19 až 24.
- 25 29. Rostlina podle nároku 27, kde shora uvedená kódující sekvence kóduje protein z *Bacillus thuringiensis*.
- 30 30. Rostlina podle nároku 28, kde alespoň jedna uvedená kódující sekvence kóduje protein z *Bacillus thuringiensis*.
31. Rostlina podle nároku 30, kde jak první, tak druhá kódující sekvence kóduje protein z *Bacillus thuringiensis*.
- 35 32. Rostlina podle libovolného z nároků 29 až 31, kde proteinem z *Bacillus thuringiensis* je protein CryIA(b).
- 40 33. Rostlina podle nároku 32, ve které je uvedený protein exprimován v množství dostatečném pro kontrolu hmyzu z řádu motýlů nebo brouků.
34. Rostlina podle nároku 33, ve které je protein exprimován v množství dostatečném pro kontrolu hmyzu vybraného ze skupiny zahrnující *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea saccharalis*, různé druhy rodu *Papaiaema*, osenice, různé druhy rodu *Spodoptera*, travičáky, drátovce a mšice.
- 45 35. Potomstvo transgenické rostliny podle libovolného z nároků 27 až 34, které obsahuje ve svém genomu stabilně integrovanou nukleotidovou sekvenci nebo její části obsahující první promotor schopný řídit expresi nukleotidové sekvence v rostlinné buňce, operabilně spojený s kódující sekvencí, která kóduje protein z *Bacillus thuringiensis* schopný usmrtit hmyz, přičemž tyto kódující sekvence vykazuje alespoň 90% homologii s nukleotidovou sekvencí obsahující 100 % kukuřičí preferovaných kodónových sekvencí pro tento protein, takže tato kódující sekvence exprimuje uvedený protein v množství dostatečném pro ochranu rostliny proti hmyzím škůdcům.
- 50

36. Způsob vytvoření kódující sekvence insekticidního proteinu z *Bacillus thuringiensis* pro kukuřici, přičemž tyto kódující sekvence vykazují alespoň 90% homologii s kódující sekvencí obsahující 100 % kukuřici preferovaných kodónových sekvencí pro tento protein, **vyznačující se tím**, že se stanoví sekvence aminokyselin předem určeného insekticidního proteinu z *Bacillus thuringiensis*, a kódující sekvence proteinu se změní nahrazením odpovídajících nativních kodonů kodony, které jsou nejvíce preferované v kukuřici tak, že tato kódující sekvence pro kukuřici vykazují alespoň 90% homologii s kódující sekvencí čistě pro kukuřici, obsahující 100 % kukuřici preferovaných kodónových sekvencí pro tento protein.
37. Způsob ochrany rostliny kukuřice proti alespoň jednomu hmyzímu škůdci, **vyznačující se tím**, že se rostlina kukuřice stabilně transformuje alespoň jednou nukleotidovou sekvencí podle libovolného z nároků 1 až 24, přičemž tato kódující sekvence kóduje insekticidní protein, takže tato transformovaná rostlina kukuřice exprimuje insekticidní protein v množství dostatečném pro ochranu rostliny proti škůdci.
38. Rostlina stabilně transformovaná nukleotidovou sekvencí, přičemž tato nukleotidová sekvence obsahuje kódující sekvenci pro kukuřici a tato kódující sekvence vykazují alespoň 90% homologii s kódující sekvencí obsahující 100 % kukuřici preferovaných kodónových sekvencí pro insekticidní protein z *Bacillus thuringiensis*, přičemž tento protein je v této transformované rostlině exprimován v množství alespoň stonásobně vyšším než při expresi proteinu za použití nativní kódující sekvence.
39. Způsob vytvoření potomstva transgenické rostliny kukuřice obsahujícího ve svém genomu stabilně integrovanou kódující sekvenci pro insekticidní protein z *Bacillus thuringiensis*, **vyznačující se tím**, že se
- (a) připraví nukleotidová sekvence obsahující první promotor schopný řídit expresi nukleotidové sekvence v rostlinné buňce, operabilně spojený s kódující sekvencí, která kóduje protein schopný usmrtit hmyz, přičemž tato kódující sekvence vykazují alespoň 90% homologii s kódující sekvencí obsahující 100 % kukuřici preferovaných kodónových sekvencí pro tento protein,
- (b) nukleotidová sekvence připravená podle stupně (a) se introdukuje do rostliny, takže se tato nukleotidová sekvence nebo její části funkčně integrují do rostlinného genomu a exprimují uvedený protein v množství dostatečném pro ochranu rostliny proti hmyzím škůdcům, a
- (c) rostlina získaná ve stupni (b) se kříží s několika genotypy kukuřice pro získání potomka obsahujícího ve svém genomu stabilně integrovanou kódující sekvenci pro insekticidní protein optimalizovanou pro kukuřici tak, že je tento insekticidní protein exprimován v množství dostatečném pro ochranu rostliny proti hmyzím škůdcům.

Zobrazení sekvencí

Informace o sekvenci 1:

- (i) charakteristiky sekvence:
- (A) délka: 4360 párů bází
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) počet řetězců: jednořetězcová
- (D) topologie: lineární
- (ii) typ molekuly: DNA
- (iii) není hypotetická

(iv) není anti-sense

(vi) původní zdroj:

- 5 (A) organismus: *Bacillus thuringiensis*
 (B) kmen: Kurstaki HD-1
 (C) konkrétní izolát: gen insekticidního krystalického proteinu CryIA(b)

(xi) znázornění sekvence 1:

	GTTAACACCC TGGGTCAAAA ATTGATATTT AGTAAAATTA GTTGCACTTT GTGCATTTTT	60
	TCATAAGATG AGTCATATGT TTTAAATTGT AGTAATGAAA AACAGTATTA TATCATAATG	120
	AATTGGTATC TTAATAAAAAG AGATGGAGGT AACTTATGGA TAACAATCCG AACATCAATG	180
	AATGCATTCC TTATAATTGT TTAAGTAACC CTGAAGTAGA AGTATTAGGT GGAGAAAGAA	240
	TAGAAACTGG TTACACCCCA ATCGATATTT CCTTGTCGCT AACGCAATTT CTTTGTAGTG	300
	AATTTGTTCG CGGTGCTGGA TTTGTGTTAG GACTAGTTGA TATAATATGG GGAATTTTTG	360
	GTCCCTCTCA ATGGGACGCA TTTCTTGAC AAATTGAACA GTTAATTAAC CAAAGAATAG	420
	AAGAATTCGC TAGGAACCAA GCCATTTCTA GATTAGAAGG ACTAAGCAAT CTTTATCAAA	480
10	TTTACGCAGA ATCTTTTAGA GAGTGGGAAG CAGATCCTAC TAATCCAGCA TTAAGAGAAG	540

AGATGCGTAT TCAATTCAAT GACATGAACA GTGCCCTTAC AACCGCTATT CCTCTTTTTG	600
CAGTTCAAAA TTATCAAGTT CCTCTTTTAT CAGTATATGT TCAAGCTGCA AATTTACATT	660
TATCAGTTTT GAGAGATGTT TCAGTGTITG GACAAAGGTG GGGATTTGAT GCCGCGACTA	720
TCAATAGTCG TTATAATGAT TTAAGTAGGC TTATTGGCAA CTATACAGAT CATGCTGTAC	780
GCTGGTACAA TACGGGATTA GAGCGTGTAT GGGGACCGGA TTCTAGAGAT TGGATAAGAT	840
ATAATCAATT TAGAAGAGAA TTAACACTAA CTGTATTAGA TATCGTTTCT CTATTTCCGA	900
ACTATGATAG TAGAACGTAT CCAATTCGAA CAGTTTCCCA ATTAACAAGA GAAATTTATA	960
CAAACCCAGT ATTAGAAAAT TTTGATGGTA GTTTTCGAGG CTCGGCTCAG GGCATAGAAG	1020
GAAGTATTAG GAGTCCACAT TTGATGGATA TACTTAACAG TATAACCATC TATACGGATG	1080
CTCATAGAGG AGAATATTAT TGGTCAGGGC ATCAAATAAT GGCTTCTCCT GTAGGGTTTT	1140
CGGGGCCAGA ATTCACTTTT CCGCTATATG GAACTATGGG AAATGCAGCT CCACAACAAC	1200
GTATTGTTGC TCAACTAGGT CAGGGCGTGT ATAGAACATT ATCGTCCACT TTATATAGAA	1260
GACCTTTTAA TATAGGGATA AATAATCAAC AACTATCTGT TCTTGACGGG ACAGAATTTG	1320
CTTATGGAAC CTCCTCAAAT TTGCCATCCG CTGTATACAG AAAAAGCGGA ACGGTAGATT	1380
CGCTGGATGA AATACCGCCA CAGAATAACA ACGTGCCACC TAGGCAAGGA TTTAGTCATC	1440
GATTAAGCCA TGTTTCAATG TTTTCGTTAG GCTTTAGTAA TAGTAGTGTA AGTATAATAA	1500
GAGCTCCTAT GTTCTCTTGG ATACATCGTA GTGCTGAATT TAATAATATA ATTCCTTCAT	1560
CACAAATTAC ACAAATACCT TTAACAAAAT CTACTAATCT TGGCTCTGGA ACTTCTGTCTG	1620
TTAAAGGACC AGGATTTACA GGAGGAGATA TTCTTCGAAG AACTTCACCT GGCCAGATTT	1680
CAACCTTAAG AGTAAATATT ACTGCACCAT TATCACAAAG ATATCGGGTA AGAATTCGCT	1740
ACGCTTCTAC CACAAATTTA CAATTCCATA CATCAATTGA CGGAAGACCT ATTAATCAGG	1800
GGAATTTTTT AGCAACTATG AGTAGTGGGA GTAATTTACA GTCCGGAAGC TTTAGGACTG	1860
TAGGTTTTAC TACTCCGTTT AACTTTTCAA ATGGATCAAG TGTATTTACG TTAAGTGCTC	1920
ATGTCTTCAA TTCAGGCAAT GAAGTTTATA TAGATCGAAT TGAATTTGTT CCGGCAGAAG	1980
TAACCTTTGA GGCAGAATAT GATTTAGAAA GAGCACAAA GCGGTGAAT GAGCTGTTTA	2040
CTTCTTCCAA TCAAATCGGG TTAAAAACAG ATGTGACGGA TTATCATATT GATCAAGTAT	2100

CCAATTTAGT TGAGTGTSTA TCTGATGAAT TTTGTCTGGA TGAAAAAAAA GAATTGTCCG	2160
AGAAAGTCAA ACATGCCGAG CGACTTAGTG ATGAGCGGAA TTTACTTCAA GATCCAAACT	2220
TTAGAGGGAT CAATAGACAA CTAGACCGTG GCTGGAGAGG AAGTACGGAT ATTACCATCC	2280
AAGGAGGCGA TGACGTATTC AAAGAGAATT ACGTTACGCT ATTGGGTACC TTTGATGAGT	2340
GCTATCCAAC GTATTTATAT CAAAAAATAG ATGAGTCGAA ATTAAAAGCC TATACCCGTT	2400
ACCAATTAAG AGGGTATATC GAAGATAGTC AAGACTTAGA AATCTATTTA ATTGCTACA	2460
ATGCCAAACA CGAAACAGTA AATGTGCCAG GTACGGGTTC CTTATGGCCG CTTTCAGCCC	2520
CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT CCCATCATTT CTCCTTGGAC ATTGATGTTG	2580
GATGTACAGA CTTAAATGAG GACTTAGGTG TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG	2640
ATGGCCATGC AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTG GTAGGAGAAG	2700
CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA AAATTGGAAT	2760
GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGCAA AAGAATCTGT AGATGCTTTA TTTGTAAACT	2820
CTCAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA ACATCGCGAT GATTCATGCG GCAGATAAAC	2880
GCGTTCATAG CATTTCGAGAA GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG	2940
CGGCTATTTT TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTCACTGC ATTCTCCCTA TATGATGCGA	3000
GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC GTGAAAGGGC	3060
ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACAACCACC GTTCGGTCCT TGTGTGTTCCG GAATGGGAAG	3120
CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC CGGGTCGTGG CTATATCCTT CGTGTACACG	3180
CGTACAAGGA GGGATATGGA GAAGGTTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAATACAG	3240
ACGAACTGAA GTTTAGCAAC TGTGTAGAAG AGGAAGTATA TCCAACAAC ACGGTAACGT	3300
GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT CGTAATCGAG	3360
GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC TGATTATGCA TCAGCCTATG	3420
AAGAAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG	3480
GGGATTACAC ACCACTACCA GCTGGCTATG TGACAAAAGA ATTAGAGTAC TTCCAGAAA	3540
CCGATAAGGT ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAAC ATTCATCGTG GACAGCGTGG	3600
AATTACTTCT TATGGAGGAA TAATATATGC TTTATAATGT AAGGTGTGCA AATAAAGAAT	3660

GATTACTGAC TTGTATTGAC AGATAAATAA GGAAATTTTT ATATGAATAA AAAACGGGCA	3720
TCACTCTTAA AAGAATGATG TCCGTTTTTT GTATGATTTA ACGAGTGATA TTAAATGTT	3780
TTTTTTGCGA AGGCTTTACT TAACGGGGTA CCGCCACATG CCCATCAACT TAAGAATTTG	3840
CACTACCCCC AAGTGTCAAA AAACGTTATT CTTTCTAAAA AGCTAGCTAG AAAGGATGAC	3900
ATTTTTTATG AATCTTTCAA TTCAAGATGA ATTACAATA TTTTCTGAAG AGCTGTATCG	3960
TCATTTAACC CCTTCTCTTT TGGGAAGAACT CGCTAAAGAA TTAGGTTTTG TAAAAAGAAA	4020
ACGAAAGTTT TCAGGAAATG AATTAGCTAC CATATGTATC TGGGGCAGTC AACGTACAGC	4080
GAGTGATTCT CTCGTTTCGAC TATGCAGTCA ATTACACGCC GCCACAGCAC TCTTATGAGT	4140
CCAGAAGGAC TCAATAAACG CTTTGATAAA AAAGCGGTG AATTTTGAAT ATATATTTTT	4200
TCTGCATTAT GGAAAAGTAA ACTTTGTAAA ACATCAGCCA TTTCAAGTGC AGCACTCAGC	4260
TATTTTCAAC GAATCCGTAT TTTAGATGCG ACGATTTTCC AAGTACCGAA ACATTTAGCA	4320
CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA CAAACTGCAG	4360

Informace o sekvenci 2:

- 5 (i) charakteristiky sekvence:
 (A) délka: 3474 párů bází
 (B) typ: nukleová kyselina
 (C) počet řetězců: jednořetězcová
 (D) topologie: lineární
- 10 (ii) typ molekuly: DNA
- (iii) je hypotetická
- (iv) není anti-sense
- 15 (vi) původní zdroj:
 (A) organismus: syntetický gen BT CryIA(b) zcela optimalizovaný pro kukuřici

(xi) znázornění sekvence 2:

ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG	60
GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG	120
AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGGC CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG	180
GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTGCGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC	240
GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG	300
GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAGATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC	360
CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC	420
CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCGGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG	480
TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTGAGCGT GTTCGGCCAG	540
CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC	600
GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGC	660
CCCGACAGCC GCGACTGGAT CCGCTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG	720
CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCCTG	780
AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT CTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC	840
CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG	900
AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG	960
ATCATGGCCA GCCCCGTGGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC	1020
ATGGGCAACG CCGCCCCCA GCAGCGCATC GTGGCCCAGC TGGGCCAGGG CGTGTACCGC	1080
ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGCCGCCCC TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG	1140
AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG	1200
TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCCAGAA CAACAACGTG	1260
CCCCCCCCGCC AGGGCTTCAG CCACCGCCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGCGGCTTC	1320

AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGCGCC CCCATGTTCA GCTGGATCCA CCGCAGCGCC	1380
GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC	1440
AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG	1500
CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCAG CCCCCTGAGC	1560
CAGCGCTACC GCGTGCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC	1620
ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC	1680
CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CTTCAACTT CAGCAACGGC	1740
AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC	1800
CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCGG AGTACGACCT GGAGCGCGCC	1860
CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG	1920
ACCGACTACC ACATCGACCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCCTGAGCGA CGAGTTCTGC	1980
CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCAGC CCAAGCGCCT GAGCGACGAG	2040
CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTGG	2100
CGCGGCAGCA CCGACATCAC CATCCAGGGC GGCGACGACG TGTTCAGGA GAACTACGTG	2160
ACCGTGCTGG GCACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG	2220
AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC	2280
CTGGAGATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCGCGGCACC	2340
GGCAGCCTGT GGCCCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGCCCA CCACAGCCAC	2400
CACCTCAGCC TGGACATCGA CGTGGGCTGC ACCGACCTGA ACGAGGACCT GGGCGTGTGG	2460
GTGATCTTCA AGATCAAGAC CCAGGACGGC CACGCCCCGCC TGGGCAACCT GGAGTTCCTG	2520
GAGGAGAAGC CCCTGGTGGG CGAGGCCCTG GCCCGCGTGA AGCGCGCCGA GAAGAAGTGG	2580
CGCGACAAGC GCGAGAAGCT GGAGTGGGAG ACCAACATCG TGTACAAGGA GGCCAAGGAG	2640
AGCGTGACG CCCTGTTCGT GAACAGCCAG TACGACCGCC TGCAGGCCGA CACCAACATC	2700
GCCATGATCC ACGCCGCCGA CAAGCGCGTG CACAGCATCC GCGAGGCCTA CCTGCCCGAG	2760
CTGAGCGTGA TCCCCGGCGT GAACGCCGCC ATCTTCGAGG AGCTGGAGGG CCGCATCTTC	2820
ACCGCCTTCA GCCTGTACGA CGCCCGCAAC GTGATCAAGA ACGGCGACTT CAACAACGGC	2880
CTGAGCTGCT GGAACGTGAA GGGCCACGTG GACGTGGAGG AGCAGAACAA CCACCGCAGC	2940
GTGCTGGTGG TGCCCGAGTG GGAGGCCGAG GTGAGCCAGG AGGTGCGCGT GTGCCCCGGC	3000
CGCGGCTACA TCCTGCGCGT GACCGCCTAC AAGGAGGGCT ACGGCGAGGG CTGCGTGACC	3060
ATCCACGAGA TCGAGAACAA CACCGACGAG CTGAAGTTCA GCAACTGCGT GGAGGAGGAG	3120
GTGTACCCCA ACAACACCGT GACCTGCAAC GACTACACCG CCACCCAGGA GGAGTACGAG	3180
GGCACCTACA CCAGCCGCAA CCGCGGCTAC GACGGCGCCT ACGAGAGCAA CAGCAGCGTG	3240
CCCGCCGACT ACGCCAGCGC CTACGAGGAG AAGGCCTACA CCGACGGCCG CCGCGACAAC	3300
CCCTGCGAGA GCAACCGCGG CTACGGCGAC TACACCCCCC TGCCCGCCGG CTACGTGACC	3360
AAGGAGCTGG AGTACTTCCC CGAGACCGAC AAGGTGTGGA TCGAGATCGG CGAGACCGAG	3420
GGCACCTTCA TCGTGACAG CGTGGAGCTG CTGCTGATGG AGGAGTAGTA CATG	3474

Informace o sekvenci 3:

- 5 (i) charakteristiky sekvence:
 (A) délka: 1961 párů bází
 (B) typ: nukleová kyselina
 (C) počet řetězců: jednořetězcová
 (D) topologie: lineární
- 10 (ii) typ molekuly: DNA
- (iii) není hypotetická
- (iv) není anti-sense
- 15 (vi) původní zdroj:
 (A) organismus: zkrácený syntetický gen BT CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici
- (xi) znázornění sekvence 3:

GATCCAACAA	TGGACAACAA	CCCCAACATC	AACGAGTGCA	TCCCCTACAA	CTGCCTGAGC	60
AACCCCGAGG	TGGAGGTGCT	GGGCGGCGAG	CGCATCGAGA	CCGGCTACAC	CCCCATCGAC	120
ATCAGCCTGA	GCCTGACCCA	GTTCTGCTG	AGCGAGTTCG	TGCCCCGGCGC	CGGCTTCGTG	180
CTGGGCCTGG	TGGACATCAT	CTGGGGCATC	TTCGGCCCCA	GCCAGTGGGA	CGCCTTCCTG	240
GTGCAGATCG	AGCAGCTGAT	CAACCAGCGC	ATCGAGGAGT	TCGCCCCGAA	CCAGGCCATC	300
AGCCGCCTGG	AGGGCCTGAG	CAACCTGTAC	CAAATCTACG	CCGAGAGCTT	CCGCGAGTGG	360
GAGGCCGACC	CCACCAACCC	CGCCCTGCGC	GAGGAGATGC	GCATCCAGTT	CAACGACATG	420
AACAGCGCCC	TGACCACCGC	CATCCCCCTG	TTCGCCGTGC	AGAACTACCA	GGTGCCCTG	480
CTGAGCGTGT	ACGTGCAGGC	CGCCAACCTG	CACCTGAGCG	TGCTGCGCGA	CGTCAGCGTG	540
TTCGGCCAGC	GCTGGGGCTT	CGACGCCGCC	ACCATCAACA	GCCGCTACAA	CGACCTGACC	600
CGCCTGATCG	GCAACTACAC	CGACCACGCC	GTGCGCTGGT	ACAACACCGG	CCTGGAGCGC	660
GTGTGGGGTC	CCGACAGCCG	CGACTGGATC	AGGTACAACC	AGTTCCGCCG	CGAGCTGACC	720
CTGACCGTGC	TGGACATCGT	GAGCCTGTTC	CCCAACTACG	ACAGCCGCAC	CTACCCCATC	780
CGCACCGTGA	GCCAGCTGAC	CCGCGAGATT	TACACCAACC	CCGTGCTGGA	GAACCTCGAC	840
GGCAGCTTCC	GCGGCAGCGC	CCAGGGCATC	GAGGGCAGCA	TCCGCAGCCC	CCACCTGATG	900
GACATCCTGA	ACAGCATCAC	CATCTACACC	GACGCCACC	GCGGCGAGTA	CTACTGGAGC	960
GGCCACCAGA	TCATGGCCAG	CCCCGTGCGC	TTCAGCGGCC	CCGAGTTCAC	CTTCCCCCTG	1020
TACGGCACCA	TGGGCAACGC	TGCACCTCAG	CAGCGCATCG	TGGCACAGCT	GGGCCAGGGA	1080
GTGTACCGCA	CCCTGAGCAG	CACCCTGTAC	CGTCGACCTT	TCAACATCGG	CATCAACAAC	1140
CAGCAGCTGA	GCGTGCTGGA	CGGCACCGAG	TTCGCCTACG	GCACCAGCAG	CAACCTGCC	1200
AGCGCCGTGT	ACCGCAAGAG	CGGCACCGTG	GACAGCCTGG	ACGAGATCCC	CCCTCAGAAC	1260
AACAACGTGC	CACCTCGACA	GGGCTTCAGC	CACCGTCTGA	GCCACGTGAG	CATGTTCCGC	1320
AGTGGCTTCA	GCAACAGCAG	CGTGAGCATC	ATCCGTGCAC	CTATGTTTAC	CTGGATTAC	1380

CGCAGTGCCG AGTTCAACAA CATCATCCCC AGCAGCCAGA TCACCCAGAT CCCCCTGACC	1440
AAGAGCACCA ACCTGGGCAG CGGCACCAGC GTGGTGAAGG GCCCCGGCTT CACCGGCGGC	1500
GACATCCTGC GCCGCACCAG CCCCAGCCAG ATCAGCACCC TGCGCCTGAA CATCACCGCC	1560
CCCCTGAGCC AGCGCTACCG CGTCCGCATC CGCTACGCCA GCACCACCAA CCTGCAGTTC	1620
CACACCAGCA TCGACGGCCG CCCCATCAAC CAGGGCAACT TCAGCGCCAC CATGAGCAGC	1680
GGCAGCAACC TGCAGAGCGG CAGCTTCCGC ACCGTGGGCT TCACCACCCC CTTCAACTTC	1740
AGCAACGGCA GCAGCGTGTT CACCCTGAGC GCCCACGTGT TCAACAGCGG CAACGAGGTG	1800
TACATCGACC GCATCGAGTT CGTGCCCGCC GAGGTGACCT TCGAGGCCGA GTACGACCTG	1860
GAGAGGGCTC AGAAGGCCGT GAACGAGCTG TTCACCAGCA GCAACCAGAT CGGCCTGAAG	1920
ACCGACGTGA CCGACTACCA CATCGATCAG GTGTAGGAGC T	1961

Informace o sekvenci 4:

5

- (i) charakteristiky sekvence:
 - (A) délka: 3508 párů bází
 - (B) typ: nukleová kyselina
 - (C) počet řetězců: jednořetězcová
 - (D) topologie: lineární

10

- (ii) typ molekuly: DNA

- (iv) není anti-sense

15

- (vi) původní zdroj:
 - (A) organismus: syntetický gen BT CryIA(b) optimalizovaný pro kukuřici o plné délce

(xi) znázornění sekvence 4:

GATCCAACAA TGGACAACAA CCCCAACATC AACGAGTGCA TCCCCTACAA CTGCCTGAGC	60
AACCCCGAGG TGGAGGTGCT GGGCGGCGAG CGCATCGAGA CCGGCTACAC CCCCATCGAC	120
ATCAGCCTGA GCCTGACCCA GTTCCTGCTG AGCGAGTTCG TGCCCGGGCGC CGGCTTCGTG	180
CTGGGCCTGG TGGACATCAT CTGGGGCATC TTCGGCCCCA GCCAGTGGGA CGCCTTCCTG	240
GTGCAGATCG AGCAGCTGAT CAACCAGCGC ATCGAGGAGT TCGCCCGCAA CCAGGCCATC	300
AGCCGCCTGG AGGGCCTGAG CAACCTGTAC CAAATCTACG CCGAGAGCTT CCGCGAGTGG	360
GAGGCCGACC CCACCAACCC CGCCCTGCGC GAGGAGATGC GCATCCAGTT CAACGACATG	420
AACAGCGCCC TGACCACCGC CATCCCCCTG TTCGCGGTGC AGAACTACCA GGTGCCCCCTG	480
CTGAGCGTGT ACGTGCAGGC CGCCAACCTG CACCTGAGCG TGCTGCGCGA CGTCAGCGTG	540
TTCGGCCAGC GCTGGGGCTT CGACGCCGCC ACCATCAACA GCCGCTACAA CGACCTGACC	600
CGCCTGATCG GCAACTACAC CGACCACGCC GTGCGCTGGT ACAACACCGG CCTGGAGCGC	660
GTGTGGGGTC CCGACAGCCG CGACTGGATC AGGTACAACC AGTTCCGCCG CGAGCTGACC	720
CTGACCGTGC TGGACATCGT GAGCCTGTTC CCCAACTACG ACAGCCGCAC CTACCCCATC	780
CGCACCGTGA GCCAGCTGAC CCGCGAGATT TACACCAACC CCGTGCTGGA GAACTTCGAC	840
GGCAGCTTCC GCGGCAGCGC CCAGGGCATC GAGGGCAGCA TCCGCAGCCC CCACCTGATG	900
GACATCCTGA ACAGCATCAC CATCTACACC GACGCCCACC GCGGCGAGTA CTACTGGAGC	960
GGCCACCAGA TCATGGCCAG CCCCCTCGGC TTCAGCGGCC CCGAGTTCAC CTTCCCCCTG	1020
TACGGCACCA TGGGCAACGC TGCACCTCAG CAGCGCATCG TGGCACAGCT GGGCCAGGGA	1080
GTGTACCGCA CCCTGAGCAG CACCCTGTAC CGTCGACCTT TCAACATCGG CATCAACAAC	1140
CAGCAGCTGA GCGTGCTGGA CGGCACCGAG TTCGCTACG GCACCAGCAG CAACCTGCCC	1200
AGCGCCGTGT ACCGCAAGAG CGGCACCGTG GACAGCCTGG ACGAGATCCC CCCTCAGAAC	1260
AACAACGTGC CACCTCGACA GGGCTTCAGC CACCGTCTGA GCCACGTGAG CATGTTCGCG	1320
AGTGGCTTCA GCAACAGCAG CGTGAGCATC ATCCGTGCAC CTATGTTTAC CTGGATTAC	1380
CGCAGTGCCG AGTTCAACAA CATCATCCCC AGCAGCCAGA TCACCCAGAT CCCCCTGACC	1440
AAGAGCACCA ACCTGGGCAG CGGCACCAGC GTGGTGAAGG GCCCCGGCTT CACCGGCGGC	1500
GACATCCTGC GCCGCACCAG CCCCAGCCAG ATCAGCACCC TGCGCGTGAA CATCACCGCC	1560

CCCCTGAGCC	AGCGCTACCG	CGTCCGCATC	CGCTACGCCA	GCACCACCAA	CCTGCAGTTC	1620
CACACCAGCA	TCGACGGCCG	CCCCATCAAC	CAGGGCAACT	TCAGCGCCAC	CATGAGCAGC	1680
GGCAGCAACC	TGCAGAGCGG	CAGCTTCCGC	ACCGTGGGCT	TCACCACCCC	CTTCAACTTC	1740
AGCAACGGCA	GCAGCGTGTT	CACCCTGAGC	GCCCACGTGT	TCAACAGCGG	CAACGAGGTG	1800
TACATCGACC	GCATCGAGTT	CGTGCCCGCC	GAGGTGACCT	TCGAGGCCGA	GTACGACCTG	1860
GAGAGGGCTC	AGAAGGCCGT	GAACGAGCTG	TTCACCAGCA	GCAACCAGAT	CGGCCTGAAG	1920
ACCGACGTGA	CCGACTACCA	CATCGATCAG	GTGAGCAACC	TGGTGGAGTG	CCTGAGCGAC	1980
GAGTTCTGCC	TGGACGAGAA	GAAGGAGCTG	AGCGAGAAGG	TGAAGCACGC	CAAGCGCCTG	2040
AGCGACGAGC	GCAACCTGCT	GCAGGACCCC	AACTTCCGCG	GCATCAACCG	CCAGCTGGAC	2100
CGCGGCTGGC	GCGGCAGCAC	CGACATCACC	ATCCAGGGCG	GCGACGACGT	GTTCAAGGAG	2160
AACTACGTGA	CCCTGCTGGG	CACCTTCGAC	GAGTGCTACC	CCACCTACCT	GTACCAGAAG	2220
ATCGACGAGA	GCAAGCTGAA	GGCCTACACC	CGCTACCAGC	TGCGCGGCTA	CATCGAGGAC	2280
AGCCAGGACC	TGGAGATCTA	CCTGATCCGC	TACAACGCCA	AGCACGAGAC	CGTGAACGTG	2340
CCCCGCACCG	GCAGCCTGTG	GCCCCTGAGC	GCCCCAGCC	CCATCGGCAA	GTGCGCCAC	2400
CACAGCCACC	ACTTCAGCCT	GGACATCGAC	GTGGGCTGCA	CCGACCTGAA	CGAGGACCTG	2460
GGCGTGTGGG	TGATCTTCAA	GATCAAGACC	CAGGACGGCC	ACGCCCCGCT	GGGCAACCTG	2520
GAGTTCCTGG	AGGAGAAGCC	CCTGGTGGGC	GAGGCCCTGG	CCGCGTGAA	GCGCGCCGAG	2580
AAGAAGTGGC	GCGACAAGCG	CGAGAAGCTG	GAGTGGGAGA	CCAACATCGT	GTACAAGGAG	2640
GCCAAGGAGA	GCGTGGACGC	CCTGTTCTGT	AACAGCCAGT	ACGACCGCCT	GCAGGCCGAC	2700
ACCAACATCG	CCATGATCCA	CGCCGCCGAC	AAGCGCGTGC	ACAGCATTCT	CGAGGCCTAC	2760
CTGCCCCGAGC	TGAGCGTGAT	CCCCGGCGTG	AACGCCGCCA	TCTTCGAGGA	GCTGGAGGGC	2820
CGCATCTTCA	CCGCCTTCAG	CCTGTACGAC	GCCCCGAACG	TGATCAAGAA	CGGCGACTTC	2880
AACAACGGCC	TGAGCTGCTG	GAACGTGAAG	GGCCACGTGG	ACGTGGAGGA	GCAGAACAAC	2940
CACCGCAGCG	TGCTGGTGGT	GCCCCGAGTG	GAGGCCGAGG	TGAGCCAGGA	GGTGC CGGTG	3000
TGCCCCGGCC	GCGGCTACAT	CCTGCGCGTG	ACCGCCTACA	AGGAGGGCTA	CGGCGAGGGC	3060
TGCGTGACCA	TCCACGAGAT	CGAGAACAAC	ACCGACGAGC	TCAAGTTCAG	CAACTGCGTG	3120
GAGGAGGAGG	TGTACCCCAA	CAACACCGTG	ACCTGCAACG	ACTACACCGC	CACCCAGGAG	3180
GAGTACGAGG	GCACCTACAC	CAGCCGCAAC	CGCGGCTACG	ACGGCGCCTA	CGAGAGCAAC	3240
AGCAGCGTGC	CCGCCGACTA	CGCCAGCGCC	TACGAGGAGA	AGGCCTACAC	CGACGGCCGC	3300
CGCGACAACC	CCTGCGAGAG	CAACCGCGGC	TACGGCGACT	ACACCCCCCT	GCCCGCCGGC	3360
TACGTGACCA	AGGAGCTGGA	GTA CT TCCCC	GAGACCGACA	AGGTGTGGAT	CGAGATCGGC	3420
GAGACCGAGG	GCACCTTCAT	CGTGGACAGC	GTGGAGCTGC	TGCTGATGGA	GGAGTAGTAC	3480
ATGTGATAGT	ACGTAAGCTC	GAGGATCT				3508

Informace o sekvenci 5:

- 5 (i) charakteristiky sekvence:
(A) délka: 1845 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) počet řetězců: jednořetězcová
(D) topologie: lineární
- 10 (ii) typ molekuly: DNA
- (iv) není anti-sense
- 15 (vi) původní zdroj:
(A) organismus: zkrácený syntetický gen BT (Perlak a kol.)

(xi) znázornění sekvence 5:

ATGGACAACA ACCCAAACAT CAACGAATGC ATTCCATACA ACTGCTTGAG TAACCCAGAA	60
GTTGAAGTAC TTGGTGGAGA ACGCATTGAA ACCGGTTACA CTCCCATCGA CATCTCCTTG	120
TCCTTGACAC AGTTTCTGCT CAGCGAGTTC GTGCCAGGTG CTGGGTTCGT TCTCGGACTA	180
GTTGACATCA TCTGGGGTAT CTTTGGTCCA TCTCAATGGG ATGCATTCTT GGTGCAAATT	240
GAGCAGTTGA TCAACCAGAG GATCGAAGAG TTCGCCAGGA ACCAGGCCAT CTCTAGGTTG	300
GAAGGATTGA GCAATCTCTA CCAAATCTAT GCAGAGAGCT TCAGAGAGTG GGAAGCCGAT	360
CCTACTAACC CAGCTCTCCG CGAGGAAATG CGTATTCAAT TCAACGACAT GAACAGCGCC	420
TTGACCACAG CTATCCCATT GTTCGCAGTC CAGAACTACC AAGTTCCTCT CTTGTCCGTG	480
TACGTTCAAG CAGCTAATCT TCACCTCAGC GTGCTTCGAG ACGTTAGCGT GTTTGGGCAA	540
AGGTGGGGAT TCGATGCTGC AACCATCAAT AGCCGTTACA ACGACCTTAC TAGGCTGATT	600
GGAAACTACA CCGACCACGC TGTTGTTGG TACAACACTG GCTTGAGCG TGTCTGGGGT	660
CCTGATTCTA GAGATTGGAT TAGATACAAC CAGTTCAGGA GAGAATTGAC CCTCACAGTT	720
TTGGACATTG TGTCTCTCTT CCCGAATAT GACTCCAGAA CCTACCCTAT CCGTACAGTG	780
TCCCAACTTA CCAGAGAAAT CTATACTAAC CCAGTTCTTG AGAACTTCGA CGGTAGCTTC	840
CGTGGTTCTG CCCAAGGTAT CGAAGGCTCC ATCAGGAGCC CACACTTGAT GGACATCTTG	900
AACAGCATAA CTATCTACAG CGATGCTCAC AGAGGAGAGT ATTACTGGTC TGGACACCAG	960
ATCATGGCCT CTCCAGTTGG ATTCAGCGGG CCCGAGTTTA CCTTTCCTCT CTATGGAAT	1020
ATGGGAAACG CCGCTCCACA ACAACGTATC GTTGCTCAAC TAGGTCAGGG TGTCTACAGA	1080
ACCTTGCTCT CCACCTTGTA CAGAAGACCC TTCAATATCG GTATCAACAA CCAGCAACTT	1140
TCCGTTCTTG ACGGAACAGA GTTCGCCTAT GGAACCTCTT CTAAGTTGCC ATCCGCTGTT	1200
TACAGAAAGA GCGGAACCGT TGATTCCTTG GACGAAATCC CACCACAGAA CAACAATGTG	1260
CCACCCAGGC AAGGATTCTC CCACAGGTTG AGCCACGTGT CCATGTTCCG TTCCGGATTC	1320
AGCAACAGTT CCGTGAGCAT CATCAGAGCT CCTATGTTCT CATGGATTCA TCGTAGTGCT	1380
GAGTTCAACA ATATCATTC TCTCTCTCAA ATCACCCTAA TCCCATTGAC CAAGTCTACT	1440
AACCTTGGAT CTGGAACCTC TGTCGTGAAA GGACCAGGCT TCACAGGAGG TGATATTCTT	1500
AGAAGAACTT CTCCTGGCCA GATTAGCACC CTCAGAGTTA ACATCACTGC ACCACTTTCT	1560
CAAAGATATC GTGTCAGGAT TCGTTACGCA TCTACCACTA ACTTGCAATT CCACACCTCC	1620
ATCGACGGAA GGCCTATCAA TCAGGGTAAC TTCTCCGCAA CCATGTCAAG CGGCAGCAAC	1680
TTGCAATCCG GCAGCTTCAG AACCGTCGGT TTCCTACTC CTTTCAACTT CTCTAACGGA	1740
TEAAGCGTTT TCACCTTAG CGCTCATGTG TTCAATTCTG GCAATGAAGT GTACATTGAC	1800
CGTATTGAGT TTGTGCCTGC CGAAGTTACC TTCGAGGCTG AGTAC	1845

90 výkresů

OBR. I

	10	20	30	40	50	60
BTHKURHD	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCCTTATAATTGTTTAAAGTAACCCCTGAA					
flsynbt.fin	C.....C.....C.....C.....G.....C.....C.....C.....CC.G.....C.....G					
bssyn	C.....C.....C.....C.....G.....C.....C.....C.....CC.G.....C.....G					
	70	80	90	100	110	120
BTHKURHD	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAAAGTGGTTACACCCCAATCGATATTTCCCTTG					
flsynbt.fin	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C.....CAG.C..					
bssyn	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C.....CAG.C..					
	130	140	150	160	170	180
BTHKURHD	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGGTGCTGGATTGTGTAGGACTA					
flsynbt.fin	AGC..G..C..G..C..GC....C..G..C..G.....C..C..C..C..C.G..C..G					
bssyn	AGC..G..C..G..C..GC....C..G..C..G.....C..C..C..C..C.G..C..G					
	190	200	210	220	230	240
BTHKURHD	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTCTTGTACAAATT					
flsynbt.fin	..G..C..C..C.....C..C..C..C...AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
bssyn	..G..C..C..C.....C..C..C..C...AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
	250	260	270	280	290	300
BTHKURHD	GAACAGTTAATTAAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA					
flsynbt.fin	..G...C.G..C.....GC.C..C..G..G.....CC.C.....G.....CAGCC.CC.G					
bssyn	..G...C.G..C.....GC.C..C..G..G.....CC.C.....G.....CAGCC.CC.G					
	310	320	330	340	350	360
BTHKURHD	GAAGGACTAAGCAATCTTTATCAAATTCGCGAGAATCTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT					
flsynbt.fin	..G..C..G.....C..G..C.....C.....C..GAGC..CC.C.....G..C..C					
bssyn	..G..C..G.....C..G..C.....C.....C..GAGC..CC.C.....G..C..C					
	370	380	390	400	410	420
BTHKURHD	CCTACTAATCCAGCATTAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTCAATGACATGAACAGTGCC					
flsynbt.fin	..C..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C...					
bssyn	..C..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C...					
	430	440	450	460	470	480
BTHKURHD	CTTACAACCGCTATTCCTCTTTTGCAGTTCAAAATTATCAAGTTCCTCTTTTATCAGTA					
flsynbt.fin	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
bssyn	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
	490	500	510	520	530	540
BTHKURHD	TATGTTCAAGCTGCAAATTTACATTTATCAGTTTTGAGAGATGTTTCAGTGTTTGGACAA					
flsynbt.fin	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C..C..C..CAGC.....C..C..G					
bssyn	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C..C..C..CAGC.....C..C..G					
	550	560	570	580	590	600
BTHKURHD	AGGTGGGGATTTGATGCCGCGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTTAACTAGGCTTATT					
flsynbt.fin	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					
bssyn	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					

OBR. 1 - pokr. 1

	610	620	630	640	650	660
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGCAACTATACAGATCATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA					
bssyn	C..C..C..C..C..G.....C..C..CC.G.....C..G.....T					
	670	680	690	700	710	720
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CCGGATTCTAGAGATTGGATAAGATATAATCAATTTAGAAGAGAATTAACACTAACTGTA					
bssyn	..C..CAGCC.C..C.....C..G..C..C..G..CC.CC.C..GC.G..C..G..C..G					
	730	740	750	760	770	780
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TTAGATATCGTTTCTCTATTTCCGAAGCTATGATAGTAGAAGCGTATCCAATTCGAACAGTT					
bssyn	C.G..C.....GAGC..G..C..C.....C..C..CC.C..C..C..C..C..C..G					
	790	800	810	820	830	840
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT					
bssyn	AG...GC.G..CC.C..G.....C..C.....C..GC.G..G..C..C..C..C..C..C					
	850	860	870	880	890	900
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGATGGATATACTT					
bssyn	..C...AGC..C.....C..G..C..C..CC.C..C..C..CC.....C..C..G					
	910	920	930	940	950	960
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AACAGTATAACCATCTATACGGATGCTCATAGAGGAGAAATATTATTGGTCAGGGCATCAA					
bssyn	C..C.....C..C..C..C..CC.C..C..G..C..C..AGC..C..C..G					
	970	980	990	1000	1010	1020
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTCGGGGCCAGAATTCACTTTTCCGCTATATGGAAC					
bssyn	..C.....CAGC..C..C..C..CAGC..C..C..G.....C..C..C..G..C..C..C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATGGGAAATGCAGCTCCACAACAACGTATTGTTGCTCAACTAGGTCAGGGCGTGTATAGA					
bssyn	C..C..T..A..T..G..G..C..C..G..A..G..G..C.....A.....CC.C					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ACATTATCGTCCACTTTATATAGAAGACCTTTTAATATAGGGATAAATAATCAACAAC					
bssyn	..CC.GAGCAG...CC.G..CC.TC.....C..C..C..C..C..C..C..G..G..G					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCTGTTCTTGACGGGACAGAAATTTGCTTATGGAACCTCCTCAAATTTGCCATCCGCTGTA					
bssyn	AGC..G..G.....C..C..G..C..C..C..C...AG.AGC..CC....CAG...C..G					

OBR. 1 - pokr. 2

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
BTHKURHD	TACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTGCTGGATGAAATACCGCCACAGAATAACAACGTG					
flsynbt.fin	...C.C..G.....C..C..G..CAGC.....C..G..C..C..T.....C.....					
bssyn	...C.C..G.....C..C..G..CAGC.....C..G..C..C..T.....C.....					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
BTHKURHD	CCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAGCCATGTTTCAATGTTTCGTTTCAGGCTTT					
flsynbt.fin	C.A..G..C..C..C..C..TC.G.....C..GAGC.....C..CAGT.....C					
bssyn	C.A..G..C..C..C..C..TC.G.....C..GAGC.....C..CAGT.....C					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
BTHKURHD	AGTAATAGTAGTGTAAGTATAATAAGAGCTCCTATGTTCTCTGGATACATCGTAGTGCT					
flsynbt.fin	..C..C..C..C..G..C..C..CC.T..A.....AGC.....T..C..C.....C					
bssyn	..C..C..C..C..G..C..C..CC.T..A.....AGC.....T..C..C.....C					
	1390	1400	1410	1420	1430	
BTHKURHD	GAATTTAATAATATAATTCCTTCATCA--CAAATTACACAAATACCTTTAACAATACTA					
flsynbt.fin	..G..C..C..C..C..C..C..--..G..GC..G..C..C..G..C..CC.G..C..GAGC.					
bssyn	..G..C..C..C..C..C..C..--..G..GC..G..C..C..G..C..CC.G..C..GAGC.					
	1440	1450	1460	1470	1480	1490
BTHKURHD	CTAATCTTGGCTCTGGAACCTTCTGTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAGATATTC					
flsynbt.fin	.C..C..G...AGC..C..CAGC..G..G..G..C..C..C..C..C..C..C..C..C..C.					
bssyn	.C..C..G...AGC..C..CAGC..G..G..G..C..C..C..C..C..C..C..C..C..C.					
	1500	1510	1520	1530	1540	1550
BTHKURHD	TTGGAAGAACTTCACCTGGCCAGATTTCAACCTTAAGAGTAAATATTACTGCACCATTAT					
flsynbt.fin	.G..CC.C..CAGC..C.....CAGC...C.GC.C..G..C..C..C..C..CC.GA					
bssyn	.G..CC.C..CAGC..C.....CAGC...C.GC.C..G..C..C..C..C..CC.GA					
	1560	1570	1580	1590	1600	1610
BTHKURHD	CACAAAGATATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACCACAAATTTACAATTCCATACAT					
flsynbt.fin	GC..GC.C..C..C..CC.C..C.....CAGC.....C..CC.G..G.....C..CA					
bssyn	GC..GC.C..C..C..CC.C..C.....CAGC.....C..CC.G..G.....C..CA					
	1620	1630	1640	1650	1660	1670
BTHKURHD	CAATTGACGGAAGACCTATTAATCAGGGGAATTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTA					
flsynbt.fin	GC..C.....CC.C..C..C..C.....C..C..CAGC..C..C.....C..C..C..C.					
bssyn	GC..C.....CC.C..C..C..C.....C..C..CAGC..C..C.....C..C..C..C.					
	1680	1690	1700	1710	1720	1730
BTHKURHD	ATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATG					
flsynbt.fin	.CC.G...AG...C.....CC.C..C..G..C..C..C..C..C..C.....CAGC..C.					
bssyn	.CC.G...AG...C.....CC.C..C..G..C..C..C..C..C..C.....CAGC..C.					
	1740	1750	1760	1770	1780	1790
BTHKURHD	GATCAAGTGTATTTACGTTAAGTGCTCATGTCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAG					
flsynbt.fin	.CAGC..C..G..C..CC.G..C..C..C..G.....CAGC.....C..G..G..C..C.					
bssyn	.CAGC..C..G..C..CC.G..C..C..C..G.....CAGC.....C..G..G..C..C.					

OBR. 1 - pokr. 3

	1800	1810	1820	1830	1840	1850
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAGTAACCTTTGAGGCAGAATATGATTTAGAAAAGAG					
bssyr.	.C..C..C..G..C..G..C..C..G..G.....C.....C..G..C..CC.G..G..G.					
	1860	1870	1880	1890	1900	1910
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CACAAAAGGCGGTGAATGAGCTGTTTACTTCTTCCAATCAAATCGGGTTAAAAACAGATG					
bssyn	.T..G.....C.....C.....C..CAGCAG...C..G.....CC.G..G..C..C.					
	1920	1930	1940	1950	1960	1970
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TGACGGATTATCATATTGATCAAGTATCCAATTTAGTTGAGTGTTTATCTGATGAATTTT					
bssyn	C..C..C..C..C.....G..GAG...CC.G..G.....CC.GAGC..C..G..C.					
	1980	1990	2000	2010	2020	2030
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GTCTGGATGAAAAAAGAATTGTCCGAGAAAGTCAAACATGCGAAGCGACTTAGTGATG					
bssyn	.C.....C..G..G..G..GC..AG.....G..G..G..C..C.....C..G..C..C.					
	2040	2050	2060	2070	2080	2090
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AGCGGAATTTACTTCAAGATCCAACTTTAGAGGGATCAATAGACAACCTAGACCGTGGCT					
bssyn	C..CC.G..G..G..C..C.....CC.C..C.....CC.C..G..G.....C....					
	2100	2110	2120	2130	2140	2150
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGAGAGGAAGTACGGATATTACCATCCAAGGAGGCGATGACGTATTCAAAGAGAATTACG					
bssyn	..C..C..C..C..C..C.....G..C.....C.....G.....G.....C....					
	2160	2170	2180	2190	2200	2210
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TTACGCTATTGGGTACCTTTGATGAGTGCTATCCAACGTATTTATATCAAAAAATAGATG					
bssyn	.G..C..GC....C.....C..C.....C..C..C..CC.G..C..G..G..C..C.					
	2220	2230	2240	2250	2260	2270
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AGTCGAAATTAAGCCTATACCCGTTACCAATTAAGAGGGTATATCGAAGATAGTCAAG					
bssyn	..AGC..GC.G..G.....C.....C.....GC.GC.C..C..C.....G..C..C..G.					
	2280	2290	2300	2310	2320	2330
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ACTTAGAAATCTATTTAATTCGCTACAATGCCAAACACGAAACAGTAAATGTGCCAGGTA					
bssyn	..C.G..G.....CC.G..C.....C.....G.....G..C..G..C.....C..C.					
	2340	2350	2360	2370	2380	2390
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CGGGTTCCTTATGGCCGCTTTTCAGCCCCAAGTCCAATCGGAAAATGTGCCCATCATCCC					
bssyn	.C..CAG.C.G.....C..GAGC.....C..C..C.....C..G..C.....C..CAG..					

OBR. 1 - pokr. 4

	2400	2410	2420	2430	2440	2450
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATCATTTCCTTGGACATTGATGTTGGATGTACAGACTTAAATGAGGACTTAGGTGTAT					
bssyn	.C..C...AG.C.....C..C..G..C..C..C..C..G..C.....C.G..C..G.					
	2460	2470	2480	2490	2500	2510
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGGTGATATTCAAGATTAAGACGCAAGATGGCCATGCAAGACTAGGAAATCTAGAATTTTC					
bssyn	C.....C.....C..G..C.....C..CC.C..G..C..C..G..G..C.					
	2520	2530	2540	2550	2560	2570
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCCAAGAGAAAACCATTTAGTAGGAGAAGCACTAGCTCGTGTGAAAAGAGCGGAGAAAAAAT					
bssyn	.G..G.....G..CC.G..G..C..G..C..G..C..C.....GC.C..C.....G..G.					
	2580	2590	2600	2610	2620	2630
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GGAGAGACAAACGTGAAAAATTGGAATGGGAAACAAATATTGTTTATAAAGAGGCAAAAG					
bssyn	..C.C.....G..C..G..GC....G....G..C..C..C..G..C..G.....C..G.					
	2640	2650	2660	2670	2680	2690
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AATCTGTAGATGCTTTATTTGTAAACTCTCAATATGATAGATTACAAGCGGATACCAACA					
bssyn	.GAGC..G..C..CC.G..C..G...AGC..G..C..CC.CC.G..G..C..C.....					
	2700	2710	2720	2730	2740	2750
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCGCGATGATTTCATGCGGCAGATAAACGCGTTCATAGCAATTCGAGAAGCTTATCTGCCTG					
bssyn	C.....C..C..C..C..C..G.....G..C.....C..G..C..C.....C.					
	2760	2770	2780	2790	2800	2810
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AGCTGTCTGTGATTCCGGGTGTCAATGCGGCTATTTTGAAGAATTAGAAGGGCGTATTT					
bssyn	AGC.....C..C..C..G..C..C..C..C..C..G..GC.G..G..C..C..C.					
	2820	2830	2840	2850	2860	2870
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TCACTGCATTCTCCCTATATGATGCGAGAAATGTCATTAAAAATGGTGATTTTAATAATG					
bssyn	C..C...AG...G..C..C..CC.C..C..G..C..G..C..C..C..C..C..C.					
	2880	2890	2900	2910	2920	2930
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GCTTATCCTGCTGGAACGTGAAAGGGCATGTAGATGTAGAAGAACAAAACAACCACCGTT					
bssyn	..C.GAG.....G..C..C..G..C..G..G..G.....CA					
	2940	2950	2960	2970	2980	2990
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CGGTCCTTGTGTTCGGAATGGGAAGCAGAAGTGTACAAAGAAGTTCGTGTCTGTCCGG					
bssyn	GC..G..G..G..G..C..G.....G..C..G...AGC..G..G..G..C..C..C..C.					

OBR. 1 - pokr. 5

	3000	3010	3020	3030	3040	3050
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	GTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACAGCGTACAAGGAGGGATATGGAGAAGGTTGCGTAA					
bssyn	.C..C.....C.....G..C..G..C..C.....C..C..C..G..C.....G.					
	3060	3070	3080	3090	3100	3110
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CCATTCATGAGATCGAGAACAATACAGACGAACTGAAGTTTAGCAACTGTGTAGAAGAGG					
bssyn	C..C.....C.....C..C.....G..C.....C.....C..G..G....					
	3120	3130	3140	3150	3160	3170
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AAGTATATCCAAACAACACGGTAACGTGTAATGATTATACTGCGACTCAAGAAGATATG					
bssyn	.G..G..C..C.....C.....G..C..C..C..C..C..C..C..C..C..G..G..G..C.					
	3180	3190	3200	3210	3220	3230
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	AGGGTACGTACACTTCTCGTAATCGAGGATATGACGGAGCCTATGAAAGCAATTCTTCTG					
bssyn	C..C.....CAGC..C..C..C..C..C.....C.....C..G.....CAGCAGC.					
	3240	3250	3260	3270	3280	3290
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	TACCAGCTGATTATGCATCAGCCTATGAAGAAAAAGCATATACAGATGGACGAAGAGACA					
bssyn	.G..C..C..C..C..C..CAGC.....C..G..G..G..C..C..C..C..C..CC.C....					
	3300	3310	3320	3330	3340	3350
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	ATCCTTGTGAATCTAACAGAGGATATGGGGATTACACACCACTACCAGCTGGCTATGTGA					
bssyn	.C..C..C..GAGC..C..C..C..C..C.....C..C..G..C..C.....C....					
	3360	3370	3380	3390	3400	3410
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
flsynbt.fin	CAAAAGAATTAGAGTACTTCCCAGAAACCGATAAGGTATGGATTGAGATCGGAGAAACGG					
bssyn	.C..G..GC.G.....C..G.....C.....G.....C.....C.....C..G..C..					
	3420	3430	3440	3450	3460	
BTHKURHD	*	*	*	*	*	
flsynbt.fin	AAGGAACATTCATCGTGGACAGCGTGAATTACTTCTTATGGAGGAATAA					
bssyn	.G..C..C.....GC.G..G..G.....G..G					...TG..G

- 101 -

OBR. 2 - pokr. 1

	730	740	750	760	770	780
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	TTAGATATCGTTTCTCTATTTCCGAACATGATAGTAGAACGTATCCAATTCGAACAGTT					
	C.G..C.....GAGC..G..C..C.....C..C..CC.C..C..C..C..C..C..C..G					
	790	800	810	820	830	840
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT					
	AG...GC.G..CC.C..G.....C..C.....C..GC.G..G..C..C..C..C..C..C..C					
	850	860	870	880	890	900
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGATGGATATACTT					
	..C...AGC..C.....C..G..C..C..CC.C..C..C..CC.....C..C..G					
	910	920	930	940	950	960
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	AACAGTATAACCATCTATACGGATGCTCATAGAGGAGAATATTATTGGTCAGGGCATCAA					
	C..C.....C..C..C..C..CC.C..C..G..C..C...AGC..C..C..G					
	970	980	990	1000	1010	1020
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTTCGGGGCCAGAATTCACCTTTTCCGCTATATGGAAC					
	..C.....CAGC..C..C..C..CAGC..C..C..G.....C..C..C..G..C..C..C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATGGGAAATGCAGCTCCACAACAACGATTTGTTGCTCAACTAGGTCAGGGCGGTATAGA					
	C..C..T..A..T..G..G..C..C..G..A..G..G..C.....A.....CC.C					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	ACATTATCGTCCACTTTTATATAGAAGACCTTTTAAATATAGGGATAAATAATCAACAATA					
	..CC.GAGCAG...CC.G..CC.TC.....C..C..C..C..C..C..C..G..G..G					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	TCTGTTCTTGACGGGACAGAATTTGCTTATGGAACCTCCTCAAATTTGCCATCCGCTGTA					
	AGC..G..G.....C..C..G..C..C..C..C...AG.AGC..CC....CAG...C..G					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	TACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTCGCTGGATGAAATACCGCCACAGAATAACAACGTG					
	...C..C..G.....C..C..G..CAGC.....C..G..C..C..T.....C.....					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	CCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAGCCATGTTTCAATGTTTCGTTCAAGGCTTT					
	C..A..G..C..C..C..C..TC.G.....C..GAGC.....C..CAGT.....C					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
bssyn	AGTAATAGTAGTGTAAGTATAATAAGAGCTCCTATGTTCTCTTGGATACATCGTAGTGCT					
	..C..C..C..C..G..C..C..CC.T..A.....AGC.....T..C..C.....C					
	1390	1400	1410	1420	1430	
BTHKURHD	*	*	*	*	*	
bssyn	GAATTTAATAATATAATTCCTTCATCA--CAAATTACACAAATACCTTTAACAAAATCTA					
	..G..C..C..C..C..C..C--..G..GC..G..C..C..G..C..CC.G..C..GAGC.					

- 103 -

OBR. 3

	10	20	30	40	50	60
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATGGACAACAACCCCAACATCAACGAGTGCATCCCCCTACAACTGCCTGAGCAACCCCGAG					
synful.mod						
	70	80	90	100	110	120
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTGGAGGTGCTGGGGCGGCGAGCGCATCGAGACCGGCTACACCCCCATCGACATCAGCCTG					
synful.mod						
	130	140	150	160	170	180
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	AGCCTGACCCAGTTCTCTGCTGAGCGAGTTTCGTGCCCGGCGCGGCTTCGTGCTGGGCCTG					
synful.mod						
	190	200	210	220	230	240
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTGGACATCATCTGGGGCATCTTCGGCCCCAGCCAGTGGGACGCCCTTCCTGGTGCAGATC					
synful.mod						
	250	260	270	280	290	300
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAGCAGCTGATCAACCAGCGCATCGAGGAGTTTCGCCCGCAACCAGGCCATCAGCCGCCTG					
synful.mod						
	310	320	330	340	350	360
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAGGGCCTGAGCAACCTGTACCAGATCTACGCCGAGAGCTTCGCGAGTGGGAGGCCGAC					
synful.mod						
	370	380	390	400	410	420
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CCCACCAACCCCGCCCTGCGCGAGGAGATGCGCATCCAGTTCAACGACATGAACAGCGCC					
synful.mod						
	430	440	450	460	470	480
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTGACCACCGCCATCCCCCTGTTTCGCCGTGCAGAACTACCAGGTGCCCTGCTGAGCGTG					
synful.mod						
	490	500	510	520	530	540
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	TACGTGCAGGCCGCCAACCTGCACCTGAGCGTGCTGCGCGACGTGAGCGTGTTCGGCCAG					
synful.mod						
	550	560	570	580	590	600
syn1T.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CGCTGGGGCTTCGACGCCGCCACCATCAACAGCCGCTACAACGACCTGACCCGCCTGATC					
synful.mod						

OBR. 3 - pokr. 1

	610	620	630	640	650	660
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GGCAACTACACCGACCACGCCGTGCGCTGGTACAACACCGGCTGGAGCGCGTGTGGGGC					
bssyn	T					
synful.mod	T					
	670	680	690	700	710	720
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CCCGACAGCCCGGACTGGATCCGCTACAACCCAGTTCCGCCCGGAGCTGACCCTGACCGTG					
bssyn	A.G.....					
synful.mod	A.G.....					
	730	740	750	760	770	780
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CTGGACATCGTGAGCCTGTTCCCAACTACGACAGCCGCACCTACCCCATCCGCACCGTG					
bssyn						
synful.mod						
	790	800	810	820	830	840
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AGCCAGCTGACCCGCGAGATCTACACCAACCCCGTGCTGGAGAACTTCGACGGCAGCTTC					
bssyn	T.....					
synful.mod	T.....					
	850	860	870	880	890	900
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCGGCAGCGCCAGGGCATCGAGGGCAGCATCCGCAGCCCCACCTGATGGACATCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	910	920	930	940	950	960
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AACAGCATCACCATCTACACCGACGCCACCGCGGCGAGTACTACTGGAGCGCCACCA					
bssyn						
synful.mod						
	970	980	990	1000	1010	1020
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ATCATGGCCAGCCCCGTGGGCTTCAGCGGCCCCGAGTTCACCTTCCCCCTGTACGGCACC					
bssyn	C.....					
synful.mod	C.....					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ATGGGCAACGCGCCCGCCAGCAGCGCATCGTGGCCAGCTGGGCCAGGGCGTGTACCGC					
bssyn	T..A..T.....A.....A.....					
synful.mod	T..A..T.....A.....A.....					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ACCCTGAGCAGCACCCTGTACCGCGCCCTTCAACATCGGCATCAACAACCAGCAGCTG					
bssyn	T..A..T.....					
synful.mod	T..A..T.....					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AGCGTGCTGGACGGCACCGAGTTCGCCTACGGCACCCAGCAGCAACCTGCCCAGCGCCGTG					
bssyn						
synful.mod						

OBR. 3 - pokr. 2

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	TACCGCAAGAGCGGCACCGTGGACAGCCTGGACGAGATCCCCCCCCAGAACAACAACGTG					
bssyn	T.....					
synful.mod	T.....					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	CCCCCCCCGAGGGCTTCAGCCACCGCCTGAGCCACGTGAGCATGTTCCGCAGCGGCTTC					
bssyn	..A..T..A.....T.....T.....					
synful.mod	..A..T..A.....T.....T.....					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	AGCAACAGCAGCGTGAGCATCATCCGCGCCCCCATGTTTCCAGCTGGATCCACCGCAGCGCC					
bssyn	T..A..T.....T.....T...					
synful.mod	T..A..T.....T.....T...					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	GAGTTCAACAACATCATCCCCAGCAGCCAGATCACCCAGATCCCCCTGACCAAGAGCACC					
bssyn						
synful.mod						
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	AACCTGGGCAGCGGCACCAGCGTGGTGAAGGGCCCCGGCTTCACCGGCGGCGACATCCTG					
bssyn						
synful.mod						
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	CGCCGCACCAGCCCCGGCCAGATCAGCACCCTGCGCGTGAACATCACCGCCCCCTGAGC					
bssyn						
synful.mod						
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	CAGCGCTACCGCGTGGCGATCCGCTACGCCAGCACCACCAACCTGCAGTTCCACACCAGC					
bssyn	C.....					
synful.mod	C.....					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	ATCGACGGCGCCCCCATCAACCAGGGCAACTTCAGCGCCACCATGAGCAGCGGCAGCAAC					
bssyn						
synful.mod						
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	CTGCAGAGCGGCAGCTTCCGCGACCGTGGGCTTCACCACCCCTTCAACTTCAGCAACGGC					
bssyn						
synful.mod						
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	*	*	*	*	*	*
synlT.mze	AGCAGCGTGTTCACCCTGAGCGCCACGTGTTCAACAGCGGCAACGAGGTGTACATCGAC					
bssyn						
synful.mod						

OBR. 3 - pokr. 3

	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCATCGAGTTCGTGCCCCGCGAGGTGACCTTCGAGGCCGAGTACGACCTGGAGCGCGCC					
bssyn	A.G..T					
synful.mod	A.G..T					
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CAGAAAGGCCGTGAACGAGCTGTTCCACCAGCAGCAACCAGATCGGCCCTGAAGACCGACGTG					
bssyn						
synful.mod						
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ACCGACTACCACATCGACCAGGTGAGCAACCTGGTGGAGTGCCTGAGCGACGAGTTCTGC					
bssyn	T.....					
synful.mod	T.....					
	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CTGGACGAGAAGAAGGAGCTGAGCGAGAAGGTGAAGCACGCCAAGCGCCTGAGCGACGAG					
bssyn	-----					
synful.mod	-----					
	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCAACCTGCTGCAGGACCCCAACTTCCGCGGCATCAACCGCCAGCTGGACCGCGGCTGG					
bssyn	-----					
synful.mod	-----					
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCGGCAGCACCGACATCACCAATCCAGGGCGGGACGACGTGTTCAAGGAGAAATTACGTG					
bssyn	-----					
synful.mod	-----					
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ACCCTGCTGGGCACCTTCGACGAGTGCTACCCACCTACCTGTACCAGAAGATCGACGAG					
bssyn	-----					
synful.mod	-----					
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AGCAAGCTGAAGGCCTACACCCGCTACCAGCTGCGCGGCTACATCGAGGACAGCCAGGAC					
bssyn	-----					
synful.mod	-----					
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CTGGAGATCTACCTGATCCGCTACAACGCCAAGCACGAGACCGTGAACGTGCCCGGCACC					
bssyn	-----					
synful.mod	-----					
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GGCAGCCTGTGGCCCCCTGAGCGCCCCCAGCCCCATCGGCAAGTGCGCCACACAGCCAC					
bssyn	-----					
synful.mod	-----					

OBR. 3 - pokr. 4

	2410	2420	2430	2440	2450	2460
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CAGTTCAGCCTGGACATCGACGTGGGCTGCACCGACCTGAACGAGGACCTGGGCGTGTGG					
synful.mod	-----					
	2470	2480	2490	2500	2510	2520
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTGATCTTCAAGATCAAGACCCAGGACGGCCACGCCCCGCTGGGCAACCTGGAGTTCCTG					
synful.mod	-----					
	2530	2540	2550	2560	2570	2580
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAGGAGAAGCCCCCTGGTGGGCGAGGCCCTGGCCCCGCGTGAAGCGCGCCGAGAAGAAGTGG					
synful.mod	-----					
	2590	2600	2610	2620	2630	2640
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CGCGACAAGCGCGAGAAGCTGGAGTGGGAGACCAACATCGTGTACAAGGAGGCCAAGGAG					
synful.mod	-----					
	2650	2660	2670	2680	2690	2700
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	AGCGTGGACGCCCTGTTCGTGAACAGCCAGTACGACCGCCTGCAGGCCGACACCAACATC					
synful.mod	-----					
	2710	2720	2730	2740	2750	2760
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GCCATGATCCACGCCGCCGACAACCGCGTGCACAGCATCGCGGAGGCCTACCTGCCCGAG					
synful.mod	-----					
	2770	2780	2790	2800	2810	2820
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTGAGCGTGATCCCCGGCGTGAACGCCGCCATCTTCGAGGAGCTGGAGGGCCGCATCTTC					
synful.mod	-----					
	2830	2840	2850	2860	2870	2880
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	ACCGCCTTCAGCCTGTACGACGCCCGCAACGTGATCAAGAACGGCGACTTCAACAACGGC					
synful.mod	-----					
	2890	2900	2910	2920	2930	2940
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTGAGCTGCTGGAACGTGAAGGGCCACGTGGACGTGGAGGAGCAGAACAACACCGCAGC					
synful.mod	-----					
	2950	2960	2970	2980	2990	3000
synlT.mze	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTGCTGGTGGTGGCCGACTGGGAGGCCGAGGTGAGCCAGGAGGTGCCCGTGTGCCCCGGC					
synful.mod	-----					

OBR. 3 - pokr. 5

	3010	3020	3030	3040	3050	3060
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CGCGGCTACATCCTGCGCGTGACCGCCTACAAGGAGGGCTACGGCGAGGGCTGCGTGACC					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3070	3080	3090	3100	3110	3120
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	ATCCACGAGATCGAGAACAACACCGACGAGCTGAAGTTCAGCAACTGCGTGGAGGAGGAG					
bssyn	-----					
synful.mod	C.....					
	3130	3140	3150	3160	3170	3180
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GTGTACCCCAACAACACCGTGACCTGCAACGACTACACCGCCACCCAGGAGGAGTACGAG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3190	3200	3210	3220	3230	3240
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	GGCACCTACACCGCCGCAACCGCGGCTACGACGGCGCCTACGAGAGCAACAGCAGCGTG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3250	3260	3270	3280	3290	3300
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CCCCCGGACTACGCCAGCGCCTACGAGGAGAAGGCCTACACCGACGGCCGCGCGACAAC					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3310	3320	3330	3340	3350	3360
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	CCCTGCGAGAGCAACCGCGGCTACGGCGACTACACCGCCCTGCCCGCCGGCTACGTGACC					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3370	3380	3390	3400	3410	3420
	*	*	*	*	*	*
syn1T.mze	AAGGAGCTGGAGTACTTCCCCGAGACCGACAAGGTGTGGATCGAGATCGGCGAGACCGAG					
bssyn	-----					
synful.mod						
	3430	3440	3450	3460		
	*	*	*	*		
syn1T.mze	GGCACCTTCATCGTGGACAGCGTGGAGCTGCTGCTGATGGAGGAGTAG					
bssyn	-----					
synful.mod						

OBR. 4

	10	20	30	40	50	60
BTHKURHD	ATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGCATTCCCTTATAATTGTTTAAAGTAACCCTGAA					
PMONBT	C.....C..A.....C.....A..C..C..C..G.....A...					
bssyn	C.....C..C.....C..G.....C..C..C..C..CC.G..C.....C..G					
	70	80	90	100	110	120
BTHKURHD	GTAGAAGTATTAGGTGGAGAAAGAATAGAAACTGGTTACACCCCAATCGATATTTCCTTG					
PMONBT	..T.....C.T.....C.C..T.....C.....T..C.....C..C.....					
bssyn	..G..G..GC.G..C..C..GC.C..C..G..C..C.....C.....C..CAG.C..					
	130	140	150	160	170	180
BTHKURHD	TCGCTAACGCAATTTCTTTTGAGTGAATTTGTTCCCGTGCTGGATTGTGTAGGACTA					
PMONBT	..CT.G..A..G.....GC.C..C..G..C..G..A.....G..C..TC.C.....					
bssyn	AGC..G..C..G..C..GC....C..G..C..G.....C..C..C..C..C.G..C..G					
	190	200	210	220	230	240
BTHKURHD	GTTGATATAATATGGGGAATTTTGGTCCCTCTCAATGGGACGCATTTCTGTACAAATT					
PMONBT	C..C..C.....T..C.....A.....T.....C..G..G.....					
bssyn	..G..C..C..C.....C..C..C..C..AGC..G.....C..C..G..G..G..C					
	250	260	270	280	290	300
BTHKURHD	GAACAGTTAATTAACCAAAGAATAGAAGAATTCGCTAGGAACCAAGCCATTTCTAGATTA					
PMONBT	..G.....G..C.....G..G..C.....G.....C.....G.....C.....G..G					
bssyn	..G..C..G..C.....GC.C..C..G..G.....CC.C.....G.....CAGCC.CC.G					
	310	320	330	340	350	360
BTHKURHD	GAAGGACTAAGCAATTTTATCAATTTACGCAGAATCTTTAGAGAGTGGGAAGCAGAT					
PMONBT	T.G.....C..C.....C..T.....GAGC..C.....C.....C...					
bssyn	..G..C..G.....C.....C.....C.....GAGC..CC.C.....G..C..C					
	370	380	390	400	410	420
BTHKURHD	CCTACTAATCCAGCATTAAAGAGAAGAGATGCGTATTCAATTCAATGACATGAACAGTGCC					
PMONBT	C.....TC.CC.C..G..A.....C.....C.....C.....C.....					
bssyn	..C..C..C..C..CC.GC.C..G.....C..C..G.....C.....C.....					
	430	440	450	460	470	480
BTHKURHD	CTTACAACCGCTATTCTCTTTTTGCAGTTCAAAATTATCAAGTTCTCTTTTATCAGTA					
PMONBT	T.G..C..A.....C..AT.G..C.....C..G..C..C.....C..G..C..G					
bssyn	..G..C.....C..C..C..G..C..C..G..G..C..C..G..G..C..GC.GAGC..G					
	490	500	510	520	530	540
BTHKURHD	TATGTTCAAGCTGCAAAATTACATTTATCAGTTTGAGAGATGTTTCAGTGTGTTGGACAA					
PMONBT	..C.....A..T...C.T..CC.CAGC..GC.TC....C...AGC.....G...					
bssyn	..C..G..G..C..C..CC.G..CC.GAGC..GC..C..C..C..CAGC.....C..C..G					
	550	560	570	580	590	600
BTHKURHD	AGGTGGGGATTGATGCCCGGACTATCAATAGTCGTTATAATGATTAACTAGGCTTATT					
PMONBT	C.....T..A..C.....C.....C..C..CC.T.....G...					
bssyn	C.C.....C..C..C.....C..C.....C..C..C..C..CC.G..CC.C..G..C					

OBR. 4 - pokr. 1

	610	620	630	640	650	660
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	GGCAACTATACAGATCATGCTGTACGCTGGTACAATACGGGATTAGAGCGTGTATGGGGA					
PMONBT	..A.....C..C..C..C.....T..T.....C..T..C..G.....C.....T					
bssyn	C..C..C..C..C..G.....C..C..CC.G.....C..G.....T					
	670	680	690	700	710	720
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CCGGATTCTAGAGATTGGATAAGATATAATCAATTTAGAAGAGAATTAACACTAACTGTA					
PMONBT	..T.....T.....C..C..G..C..G.....G..C..C..A..T					
bssyn	..C..CAGCC..C..C.....C..G..C..C..G..CC.CC.C..GC.G..C..G..C..G					
	730	740	750	760	770	780
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TTAGATATCGTTTCTCTATTTCCGAACATATGATAGTAGAACGTATCCAATTCGAACAGTT					
PMONBT	..G..C..T..G.....C..C.....CTCC.....C..C..T..C..T.....G					
bssyn	C.G..C.....GAGC..G..C..C.....C..C..CC.C..C..C..C..C..C..G					
	790	800	810	820	830	840
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TCCCAATTAACAAGAGAAATTTATACAAACCCAGTATTAGAAAATTTTGATGGTAGTTTT					
PMONBT	C..T..C.....C.....T.....TC..T..G..C..C..C.....C..C					
bssyn	AG...GC.G..CC.C..G.....C..C.....C..GC.G..C..C..C..C..C..C					
	850	860	870	880	890	900
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	CGAGGCTCGGCTCAGGGCATAGAAGGAAGTATTAGGAGTCCACATTTGATGGATATACTT					
PMONBT	..T..T..T..C..A..T..C.....CTCC..C.....C.....C.....C..CT.G					
bssyn	..C...AGC..C.....C..G..C..C..CC.C..C..C..CC.....C..C..G					
	910	920	930	940	950	960
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	AACAGTATAACCATCTATACGGATGCTCATAGAGGAGAAATATTATTGGTCAGGGCATCAA					
PMONBT	C.....T.....C.GC.....C.....G.....C.....T..A..C..G					
bssyn	C..C.....C..C..C..C..CC.C..C..C..C..C..AGC..C..C..C					
	970	980	990	1000	1010	1020
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATAATGGCTTCTCCTGTAGGGTTTTCGGGGCCAGAAATTCACTTTCCGCTATATGGAAC					
PMONBT	..C.....C.....A..T..A..CAGC.....C..G..T..C.....T..C.....					
bssyn	..C.....CAGC..C..C..C..CAGC..C..C..G.....C..C..C..G..C..C..C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ATGGGAAATGCAGCTCCACAACAACGTATTGTTGCTCAACTAGGTCAGGGCGTGTATAGA					
PMONBT	C..C.....C.....C.....C.....T..C..C...					
bssyn	C..C..T..A..T..G..G..C..C..G..A..G..G..C.....A.....CC.C					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	ACATTATCGTCCACTTTATATAGAAGACCTTTAATATAGGGATAAATAATCAACAAC					
PMONBT	..C..G..T.....C..G..C.....C..C.....C..T..C..C..C..G.....T					
bssyn	..CC.GAGCAG...CC.G..CC.TC.....C..C..C..C..C..C..C..G..G..G					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	*	*	*	*	*	*
BTHKURHD	TCTGTTCTTGACGGGACAGAATTTGCTTATGGAACCTCCTCAAATTTGCCATCCGCTGTA					
PMONBT	..C.....A.....G..C..C.....T..T..C.....T					
bssyn	AGC..G..G.....C..C..G..C..C..C..C..AG.AGC..CC....CAG...C..G					

OBR. 4 - pokr. 2

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TACAGAAAAAGCGGAACGGTAGATTCTGCTGGATGAAATACCGCCACAGAATAACAACGTG					
bssyn	G.....C..T....CT....C.....C..A.....C.....T...					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	CCACCTAGGCAAGGATTTAGTCATCGATTAAAGCCATGTTTCAATGTTTCGTTTCAGGCTTT					
bssyn	C.....CTCC..CA..G..G.....C..G..C.....C.....C..A..C					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	AGTAATAGTAGTGTAAGTATAATAAGAGCTCCTATGTTCTCTGGATACATCGTAGTGCT					
bssyn	..C..C...TCC..G..C..C..C.....A.....T.....					
	1390	1400	1410	1420	1430	
BTHKURHD	*	*	*	*	*	
PHONBT	GAATTTAATAATATAATTTCCTTCATCA--CAAATTACACAAATACCTTTAACAAAATCTA					
bssyn	..G..C..C.....C.....C..T--.....C..C.....C..A..G..C..G....					
	1440	1450	1460	1470	1480	1490
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	CTAATCTTGGCTCTGGAACCTCTGTCGTTAAAGGACCAGGATTTACAGGAGGAGATATTC					
bssyn	C.....A.....G.....C..C.....T.....					
	1500	1510	1520	1530	1540	1550
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TTGGAAGAACTTCACCTGGCCAGATTTCAACCTTAAGAGTAAATATTACTGCACCATTAT					
bssyn	..A.....T.....AGC...C..C.....T..C..C.....C..T..					
	1560	1570	1580	1590	1600	1610
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	CACAAAGATATCGGGTAAGAATTCGCTACGCTTCTACCACAAATTTACAATTCATACAT					
bssyn	.T.....T..C..G.....T.....A.....T..C..G.....C..C..					
	1620	1630	1640	1650	1660	1670
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	CAATTGACGGAAGACCTATTAATCAGGGGAATTTTTCAGCAACTATGAGTAGTGGGAGTA					
bssyn	.C..C.....G.....C.....T..C..C..C.....C...TCA..C..C..C..					
	1680	1690	1700	1710	1720	1730
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	ATTTACAGTCCGGAAGCTTTAGGACTGTAGGTTTTACTACTCCGTTTAACTTTTCAAATC					
bssyn	.C..G..A.....C.....C..A..C..C.....C.....T..C.....C..T..C..					
	1740	1750	1760	1770	1780	1790
BTHKURHD	*	*	*	*	*	*
PHONBT	GATCAAGTGATTTTACGTTAAGTGCTCATGTCCTTCAATTCAGGCAATGAAGTTTATATAG					
bssyn	C..T..C..CC.T..C.....G.....T.....G..C..T..					

OBR. 4 - pokr. 3

	1800	1810	1820	1830	1840
BTHKURHD	*	*	*	*	*
PMONBT	ATCGAATTGAATTTGTTCCGGCAGAAAGTAACCTTTGAGGCAGAATA-----				
bssyn	.C..T.....G.....G..T..C.....T.....C.....T..G..-----				
	.C..C..C..G..C..G..C..C..G..G.....C.....C..G..CGACCTGGAGAGGG				

BTHKURHD	-----
PMONBT	-----
bssyn	CTCAGAAAGGCCGTGAACGAGCTGTTCAACCAGCAGCAACCAGATCGGCCTGAAGACCGACG

BTHKURHD	-----T
PMONBT	-----C
bssyn	TGACCGACTACCACATCGATCAGGTGTAG

OBR. 5

	10	20	30	40	50	60
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	ATGGACAACAACCCAAACATCAACGAATGCATTCCATACAACCTGCTTGAGTAACCCAGAA	C.....G.....C..C.....C....C.....C..G				
	70	80	90	100	110	120
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTTGAAGTACTTGGTGGAGAACGCATTGAAACCGGTTACACTCCCATCSACATCTCCTTG	..G..G..G..G..C..C..G.....C..G.....C.....C.....AG.C..				
	130	140	150	160	170	180
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	TCCTTGACACAGTTTCTGCTCAGCGAGTTCGTGCCAGGTGCTGGGTTCCTTCTCGGACTA	AG.C....C.....C.....G.....C..C..C..C.....G..G..C..G				
	190	200	210	220	230	240
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GTTGACATCATCTGGGGTATCTTTGGTCCATCTCAATGGGATGCATTCTGGTGCAAATT	..G.....C.....C..C..CAGC..G.....C..C.....G..C				
	250	260	270	280	290	300
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAGCAGTTGATCAACCAGAGGATCGAAGAGTTCGCCAGGAACCAGGCCATCTCTAGGTTG	C.....C.C.....G.....C.C.....AGCC.CC..				
	310	320	330	340	350	360
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GAAGGATTGAGCAATCTCTACCAAATCTATGCAGAGAGCTTCAGAGAGTGGGAAGCCGAT	..G..CC.....C..G.....C..C.....C.C.....G.....C				
	370	380	390	400	410	420
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	CTACTAACCCAGCTCTCCGCSAGGAAATGGGTATTCAATTCAACGACATGACAGCGCC	..C..C.....C..C..G.....G.....C..C..G.....				
	430	440	450	460	470	480
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	TTGACCACAGCTATCCCAATTGTTCCAGTCCAGAACTACCAAGTTCTCTCTTGTCCGTG	C.....C..C.....CC.....C..G.....G..G..C..GC..AG....				
	490	500	510	520	530	540
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	TACGTTCAAGCAGCTAATCTTCACCTCAGCGTGCTTCGAGACGTTAGCGTGTTTGGGCAA	G..G..C..C..C..G.....G.....G..C.....C.....C..C..G				
	550	560	570	580	590	600
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	AGGTGGGGATTTCGATGCTGCAACCATCAATAGCCGTTACAACGACCTTACTAGGCTGATT	C.C.....C.....C..C..C.....C.....C.....G..CC.C.....C				
	610	620	630	640	650	660
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	GGAAACTACACCGACCACGCTGTTTCGTTGGTACAACACTGGCTTGGAGCGTGTCTGGGGT	..C.....C.....C..G..C.....C..C.....C..G.....				
	670	680	690	700	710	720
PHONBT	*	*	*	*	*	*
bssyn	CCTGATTCTAGAGATTGGATTAGATACAACCAGTTCAGGAGAGAATTGACCCCTCACAGTT	..C..CAGCC.C..C.....C..G.....C.CC.C..GC.....G..C..G				

OBR. 5 - pokr. 1

	730	740	750	760	770	780
PMONBT	TTGGACATTGTGTCTCTCTTCCCGAACTATGACTCCAGAACCTACCCTATCCGTACAGTG					
bssyn	C.....C...AGC..G.....C.....C...AG.C.C.....C.....C..C...					
	790	800	810	820	830	840
PMONBT	TCCCAACTTACCAGAGAAATCTATACTAATCCAGTTCTTGAGAACTTCGACGGTAGCTTC					
bssyn	AG...G..G...C.C..G..T..C..C.....C..G..G.....C.....					
	850	860	870	880	890	900
PMONBT	CGTGGTTCTGCCCAAGGTATCGAAGGCTCCATCAGGAGCCACACTTGATGGACATCTTG					
bssyn	..C..CAGC.....G..C.....G...AG....C.C.....C...C.....C..					
	910	920	930	940	950	960
PMONBT	AACAGCATAACTATCTACAGCGATGCTCACAGAGGAGATTACTGGTCTGGACACCAG					
bssyn	C..C.....C...C..C...C.C..C.....C.....AGC..C.....					
	970	980	990	1000	1010	1020
PMONBT	ATCATGGCCTCTCCAGTTGGATTACGCGGGCCGAGTTTACCTTTCCTCTCTATGGAAC					
bssyn	AGC..C..C..C.....C.....C.....C..C..G..C..C..C					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
PMONBT	ATGGGAAACGCCGCTCCACAACAACGTATCGTTGCTCAACTAGGTACAGGTGTCTACAGA					
bssyn	C.....T..A..T..G..G..C.....G..A..G..G..C.....A..G..C..C					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
PMONBT	ACCTTGTCTTCCACCTTGTACAGAAGACCCTTCAATATCGGTATCAACAACCAGCAACTT					
bssyn	...C..AGCAG....C.....C.TC....T.....C.....C.....G..G					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
PMONBT	TCCGTTCTTGACGGAACAGAGTTTCGCTATGGAACCTCTTCAACTTGCCATCCGCTGTT					
bssyn	AG...G..G.....C..C.....C..C...AGCAGC...C....CAG...C..G					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
PMONBT	TACAGAAAGAGCGGAACCGTTGATTCCTTGGACGAAATCCCACCACAGAACAACAATGTG					
bssyn	...C.C.....C.....G..CAG.C.....G.....C..T.....C...					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
PMONBT	CCACCCAGGCAAGGATTCTCCACAGGTTGAGCCACGTGTCCATGTTCCGTTCCGGATTTC					
bssyn	TC.A..G..C...AG....C.TC.....AG.....CAGT..C...					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
PMONBT	AGCAACAGTTCCGTGAGCATCATCAGAGCTCCTATGTTCTCATGGATTATCGTAGTGCT					
bssyn	CAG.....C.T..A.....AGC.....C..C.....C					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
PMONBT	GAGTTCAACAATATCATTCCTTCTCTCAAATCACCCAAATCCCATTGACCAAGTCTACT					
bssyn	C.....C..CAG.AGC..G.....G.....CC.....AGC..C					

OBR. 5 - pokr. 2

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	AACCTTGGATCTCGAACTTCTGTCTGTGAAAGGACCAGGCTTCACAGGAGGTGATATTCTT					
bssyn	G..CAGC..C..CAGC..G.....G..C..C.....C..C..C..C..G					
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	AGAAGAACTTCTCCTGGCCAGATTAGCACCCCTCAGAGTTAACATCACTGCACCACTTTCT					
bssyn	C.CC.C..CAGC..C.....C.....GC.C..G.....C..C..C..GAGC					
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	CAAAGATATCGTGTGTCAGGATTCTGTTACGCATCTACCACTAACTTGCAATTCCACACCTCC					
bssyn	..GC.C..C..C..C.C..C..C.....CAGC.....C..C..G.....AG.					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	ATCGACGGAAGGCCTATCAATCAGGGTAACTTCTCCGCAACCATGTCAAGCGGCAGCAAC					
bssyn	CC.C..C.....C.....C.....AG...C.....AGC.....					
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TTGCAATCCGGCAGCTTCAGAACCGTCGGTTTCACTACTCCTTTCAACTTCTCTAACGGA					
bssyn	C....GAG.....C.C.....G..C.....C..C..C.....AGC.....C					
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	*	*	*	*	*	*
PHONBT	TCAAGCGTTTTTACCCTTAGCGCTCATGTGTTCAATTCTGGCAATGAAGTGTACATTGAC					
bssyn	AGC.....G.....G.....C..C.....CAGC.....C..G.....C...					
	1810	1820	1830	1840		
	*	*	*	*		
PHONBT	CGTATTGAGTTTTTCCCTGCCGAAGTTACCTTCCAGGCTGAGTA-----					
bssyn	..C..C.....C.....C.....G..G.....C.....CGACCTGGAGAGGGCT					
PHONBT	-----					
bssyn	CAGAAGGCCGTGAACGAGCTGTTCAACAGCAGCAACCAGATCGGCCTGAAGACCGACGTG					
PHONBT	-----C					
bssyn	ACCGACTACCACATCGATCAGGTGTAG					

OBR. 6

64 ATGGACCTGC TGCCCGACGC CCGCATCGAG GACAGCCTGT GCATCGCCGA GGGCAACAAC
 MetAspLeu LeuProAsp AlaArgIleGlu AspSerLeu CysIleAla GluGlyAsnAsn
 124 ATCGACCCCT TCGTGAGCGC CAGCACCGTG CAGACCGGCA TCAACATCGC CGGCCGCATC
 IleAspPro PheValSer AlaSerThrVal GlnThrGly IleAsnIle AlaGlyArgIle
 184 CTGGGCGTGC TGGGCGTGCC CTTCGCCGGC CAGCTGGCCA GCTTCTACAG CTTCTGGTG
 LeuGlyVal LeuGlyVal PropheAlaGly GlnLeuAla SerPheTyr SerPheLeuVal
 244 GGCGAGCTGT GGCCCCGCGG CCGCGACCAG TGGGAGATCT TCCTGGAGCA CGTGGAGCAG
 GlyGluLeu TrpProArg GlyArgAspGln TrpGluIle PheLeuGlu HisValGluGln
 304 CTGATCAACC AGCAGATCAC CGAGAACGCC CGCAACACCG CCCTGGCCCCG CCTGCAGGGC
 LeuIleAsn GlnGlnIle ThrGluAsnAla ArgAsnThr AlaLeuAla ArgLeuGlnGly
 364 CTGGGCGACA GCTTCCGCGC CTACCAGCAG AGCCTGGAGG ACTGGCTGGA GAACCGCGAC
 LeuGlyAsp SerPheArg AlaTyrGlnGln SerLeuGlu AspTrpLeu GluAsnArgAsp
 424 GACGCCCGCA CCCGCAGCGT GCTGTACACC CAGTACATCG CCCTGGAGCT GGACTTCCTG
 AspAlaArg ThrArgSer ValLeuTyrThr GlnTyrIle AlaLeuGlu LeuAspPheLeu
 484 AACGCCATGC CCCTGTTCGC CATCCGCAAC CAGGAGGTGC CCCTGCTGAT GGTGTACGCC
 AsnAlaMet ProLeuPhe AlaIleArgAsn GlnGluVal ProLeuLeu MetValTyrAla
 544 CAGGCCGCCA ACCTGCACCT GCTGCTGCTG CGCGACGCCA GCCTGTTCCG CAGCGAGTTC
 GlnAlaAla AsnLeuHis LeuLeuLeuLeu ArgAspAla SerLeuPhe GlySerGluPhe
 604 GGCCTGACCA GCCAGGAGAT CCAGCGCTAC TACGAGCGCC AGGTGGAGCG CACCCGCGAC
 GlyLeuThr SerGlnGlu IleGlnArgTyr TyrGluArg GlnValGlu ArgThrArgAsp
 664 TACAGCGACT ACTGCGTGA GTGGTACAAC ACCGGCCTGA ACAGCCTGCG CGGCACCAAC
 TyrSerAsp TyrCysVal GluTrpTyrAsn ThrGlyLeu AsnSerLeu ArgGlyThrAsn
 724 GCCGCCAGCT GGGTGGGCTA CAACCACTTC CGCCGCGACC TGACCCTGGG CGTGCTGGAC
 AlaAlaSer TrpValArg TyrAsnGlnPhe ArgArgAsp LeuThrLeu GlyValLeuAsp
 784 CTGGTGGCCC TGTTCCCCAG CTACGACACC CGCACCTACC CCATCAACAC CAGCGCCCAG
 LeuValAla LeuPhePro SerTyrAspThr ArgThrTyr ProIleAsn ThrSerAlaGln
 844 CTGACCCGCG AGGTGTACAC CGACGCCATC GGCGCCACCG GCGTGAACAT GGCCAGCATG
 LeuThrArg GluValTyr ThrAspAlaIle GlyAlaThr GlyValAsn MetAlaSerMet
 904 AACTGGTACA ACAACAACGC CCCCAGCTTC AGCGCCATCG AGGCCGCGC CATCCGCAGC
 AsnTrpTyr AsnAsnAsn AlaProSerPhe SerAlaIle GluAlaAla AlaIleArgSer
 964 CCCCACCTGC TGGACTTCCT GGAGCAGCTG ACCATCTTCA GCGCCAGCAG CCGCTGGAGC
 ProHisLeu LeuAspPhe LeuGluGlnLeu ThrIlePhe SerAlaSer SerArgTrpSer
 1024 AACACCCGCC ACATGACCTA CTGGCGCGGC CACACCATCC AGAGCCGCCC CATCGGCGGC
 AsnThrArg HisMetThr TyrTrpArgGly HisThrIle GlnSerArg ProIleGlyGly

OBR. 6 - pokr. 1

1084 GGCCTGAACA CCAGCACCCA CGGCGCCACC AACACCAGCA TCAACCCCGT GACCCTGCGC
 GlyLeuAsn ThrSerThr HisGlyAlaThr AsnThrSer IleAsnPro ValThrLeuArg
 1144 TTGCCAGCC GCGACGTGTA CCGCACCGAG AGCTACGCCG GCGTGCTGCT GTGGGGCATC
 PheAlaSer ArgAspVal TyrArgThrGlu SerTyrAla GlyValLeu LeuTrpGlyIle
 1204 TACCTGGAGC CCATCCACGG CGTGCCACCC GTGCGCTTCA ACTTCACCAA CCCCAGAAC
 TyrLeuGlu ProIleHis GlyValProThr ValArgPhe AsnPheThr AsnProGlnAsn
 1264 ATCAGCGACC GCGGCACCGC CAACTACAGC CAGCCCTACG AGAGCCCCCG CCTGCAGCTG
 IleSerAsp ArgGlyThr AlaAsnTyrSer GlnProTyr GluSerPro GlyLeuGlnLeu
 1324 AAGGACAGCG AGACCGAGCT GCGCCCCGAG ACCACCGAGC GCGCCAACTA CGAGAGCTAC
 LysAspSer GluThrGlu LeuProProGlu ThrThrGlu ArgProAsn TyrGluSerTyr
 1384 AGCCACCGCC TGAGCCACAT CGGCATCATC CTGCAGAGCC GCGTGAACGT GCGCGTGAC
 SerHisArg LeuSerHis IleGlyIleIle LeuGlnSer ArgValAsn ValProValTyr
 1444 AGCTGGACCC ACCGCAGCGC CGACCGCACC AACACCATCG GCGCCAAACG CATCACCCAG
 SerTrpThr HisArgSer AlaAspArgThr AsnThrIle GlyProAsn ArgIleThrGln
 1504 ATCCCCATGG TGAAGGCCAG CGAGCTGCCC CAGGGCACCA CCGTGGTGCG CGGCCCCGGC
 IleProMet ValLysAla SerGluLeuPro GlnGlyThr ThrValVal ArgGlyProGly
 1564 TTCACCGCG GCGACATCCT GCGCCGCACC AACACCGCGC GCTTCGGCCC CATCCGCGTG
 PheThrGly GlyAspIle LeuArgArgThr AsnThrGly GlyPheGly ProIleArgVal
 1624 ACCGTGAACG GCGCCCTGAC CCAGCGCTAC CGCATCGGCT TCCGCTACGC CAGCACCGTG
 ThrValAsn GlyProLeu ThrGlnArgTyr ArgIleGly PheArgTyr AlaSerThrVal
 1684 GACTTCGACT TCTTCGTGAG CCGCGCGCGC ACCACCGTGA ACAACTTCCG CTTCCTGCGC
 AspPheAsp PhePheVal SerArgGlyGly ThrThrVal AsnAsnPhe ArgPheLeuArg
 1744 ACCATGAACA GCGGCGACGA GCTGAAGTAC GGCAACTTCG TGCGCCGCGC CTTCAACACC
 ThrMetAsn SerGlyAsp GluLeuLysTyr GlyAsnPhe ValArgArg AlaPheThrThr
 1804 CCCTTCACCT TCACCCAGAT CCAGGACATC ATCCGCACCA GCATCCAGGG CCTGAGCGGC
 ProPheThr PheThrGln IleGlnAspIle IleArgThr SerIleGln GlyLeuSerGly
 1864 AACGGCGAGG TGTACATCGA CAAGATCGAG ATCATCCCCG TGACCGCCAC CTTGAGGCGC
 AsnGlyGlu ValTyrIle AspLysIleGlu IleIlePro ValThrAla ThrPheGluAla
 1924 GAGTACGACC TGGAGCGCGC CCAGGAGGCC GTGAACGCCC TGTTCACCAA CACCAACCCC
 GluTyrAsp LeuGluArg AlaGlnGluAla ValAsnAla LeuPheThr AsnThrAsnPro
 1984 CGCCGCCTGA AGACCGACGT GACCGACTAC CACATCGACC AGGTGAGCAA CCTGGTGGCC
 ArgArgLeu LysThrAsp ValThrAspTyr HisIleAsp GlnValSer AsnLeuValAla
 2044 TGCCTGAGCG ACCGATTCTG CCTGGACGAG AAGCGCGAGC TGCTGGAGAA GGTGAAGTAC
 CysLeuSer AspGluPhe CysLeuAspGlu LysArgGlu LeuLeuGlu LysValLysTyr

OBR. 6 pokr. 2

2104 GCCAAGCGCC TGAGCGACGA GCGCAACCTG CTGCAGGACC CCAACTTCAC CAGCATCAAC
 AlaLysArg LeuSerAsp GluArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPhe ThrSerIleAsn
 2164 AAGCAGCCCG ACTTCATCAG CACCAACGAG CAGAGCAACT TCACCAGCAT CCACGAGCAG
 LysGlnPro AspPheIle SerThrAsnGlu GlnSerAsn PheThrSer IleHisGluGln
 2224 AGCGAGCACG GCTGGTGGG CAGCGAGAAC ATCACCATCC AGGAGGGCAA CGACGTGTTC
 SerGluHis GlyTrpTrp GlySerGluAsn IleThrIle GlnGluGly AsnAspValPhe
 2284 AAGGAGAACT ACGTGACCCT GCCCGGCACC TTCAACGAGT GCTACCCAC CTACCTGTAC
 LysGluAsn TyrValThr LeuProGlyThr PheAsnGlu CysTyrPro ThrTyrLeuTyr
 2344 CAGAAGATCG GCGAGAGCGA GCTGAAGGCC TACACCCGCT ACCAGCTGCG CGGCTACATC
 GlnLysIle GlyGluSer GluLeuLysAla TyrThrArg TyrGlnLeu ArgGlyTyrIle
 2404 GAGGACAGCC AGGACCTGGA GATCTACCTG ATCCGCTACA ACGCCAAGCA CGAGACCCCTG
 GluAspSer GlnAspLeu GluIleTyrLeu IleArgTyr AsnAlaLys HisGluThrLeu
 2464 GACGTGCCCC GCACCGAGAG CCTGTGGCCC CTGAGCGTGG AGAGCCCCAT CGGCCGCTGC
 AspValPro GlyThrGlu SerLeuTrpPro LeuSerVal GluSerPro IleGlyArgCys
 2524 GGCGAGCCCA ACCGCTGCGC CCCCCACTTC GAGTGAACC CCGACCTGGA CTGCAGCTGC
 GlyGluPro AsnArgCys AlaProHisPhe GluTrpAsn ProAspLeu AspCysSerCys
 2584 CGCGACGGCG AGAAGTGGCG CCACCACAGC CACCACTTCA GCCTGGACAT CGACGTGGGC
 ArgAspGly GluLysCys AlaHisHisSer HisHisPhe SerLeuAsp IleAspValGly
 2644 TGCACCGACC TGCACGAGAA CCTGGGCGTG TGGGTGGTGT TCAAGATCAA GACCCAGGAG
 CysThrAsp LeuHisGlu AsnLeuGlyVal TrpValVal PheLysIle LysThrGlnGlu
 2704 GGCCACGCCC GCCTGGGCAA CCTGGAGTTC ATCGAGGAGA AGCCCCTGCT GGGCGAGGCC
 GlyHisAla ArgLeuGly AsnLeuGluPhe IleGluGlu LysProLeu LeuGlyGluAla
 2764 CTGAGCCCGG TGAAGCGCGC CGAGAAGAAG TGGCGCGACA AGCGCGAGAA GCTGCAGCTG
 LeuSerArg ValLysArg AlaGluLysLys TrpArgAsp LysArgGlu LysLeuGlnLeu
 2824 GAGACCAAGC GCGTGACAC CGAGGCCAAG GAGGCCGTGG ACGCCCTGTT CGTGGACAGC
 GluThrLys ArgValTyr ThrGluAlaLys GluAlaVal AspAlaLeu PheValAspSer
 2884 CAGTACGACC GCCTGCAGGC CGACACCAAC ATCGGCATGA TCCAGCCCGC CGACAAGCTG
 GlnTyrAsp ArgLeuGln AlaAspThrAsn IleGlyMet IleHisAla AlaAspLysLeu
 2944 GTGCACCGCA TCCGCGAGGC CTACCTGAGC GAGCTGCCCC TGATCCCCGG CGTGAACGCC
 ValHisArg IleArgGlu AlaTyrLeuSer GluLeuPro ValIlePro GlyValAsnAla
 3004 GAGATCTTCG AGGAGCTGGA GGGCCACATC ATCACCGCCA TCAGCCTGTA CGACGCCCCG
 GluIlePhe GluGluLeu GluGlyHisIle IleThrAla IleSerLeu TyrAspAlaArg

OBR. 6 - pokr. 3

3064 AACGTGGTGA AGAACGGCGA CTTCAACAAC GGCCTGACCT GCTGGAACGT GAAGGGCCAC
 AsnValVal LysAsnGly AspPheAsnAsn GlyLeuThr CysTrpAsn ValLysGlyHis
 3124 GTGGACGTGC ACCAGAGCCA CCACCGCAGC GACCTGGTGA TCCCCGAGTG GGAGGCCGAG
 ValAspVal GlnGlnSer HisHisArgSer AspLeuVal IleProGlu TrpGluAlaGlu
 3184 GTGAGCCAGG CCGTGCGCGT GTGCCCCGGC TCGGGCTACA TCCTGCGCGT GACCGCCTAC
 ValSerGln AlaValArg ValCysProGly CysGlyTyr IleLeuArg ValThrAlaTyr
 3244 AAGGAGGGCT ACGGCGAGGG CTGCGTGACC ATCCACGAGA TCGAGAACAA CACCGACGAG
 LysGluGly TyrGlyGlu GlyCysValThr IleHisGlu IleGluAsn AsnThrAspGlu
 3304 CTGAAGTTCA AGAACCGCGA GGAGGAGGAG GTGTACCCCA CCGACACCGG CACCTGCAAC
 LeuLysPhe LysAsnArg GluGluGluGlu ValTyrPro ThrAspThr GlyThrCysAsn
 3364 GACTACACCG CCCACCAGGG CACCGCCGGC TCGCCGACG CCTGCAACAG CCGCAACGCC
 AspTyrThr AlaHisGln GlyThrAlaGly CysAlaAsp AlaCysAsn SerArgAsnAla
 3424 GGCTACGAGG ACGCCTACGA GGTGGACACC ACCGCCAGCG TGAACCTACAA GCCCACCTAC
 GlyTyrGlu AspAlaTyr GluValAspThr ThrAlaSer ValAsnTyr LysProThrTyr
 3484 GAGGAGGAGA CCTACACCGA CGTGCGCCGC GACAACCACT GCGAGTACGA CCGCGGCTAC
 GluGluGlu ThrTyrThr AspValArgArg AspAsnHis CysGluTyr AspArgGlyTyr
 3544 GTGAACCTACC CCCCCGTGCC CGCCGGCTAC GTGACCAAGG AGCTGGAGTA CTTCCCCGAG
 ValAsnTyr ProProVal ProAlaGlyTyr ValThrLys GluLeuGlu TyrPheProGlu
 3604 ACCGACACCG TGTGGATCGA GATCGGCGAG ACCGAGGGCA AGTTCATCGT GGACAGCGTG
 ThrAspThr ValTrpIle GluIleGlyGlu ThrGluGly LysPheIle ValAspSerVal
 3664 GAGCTGCTGC TGATGGAGGA GTAG
 GluLeuLeu LeuMetGlu Glu---

OBR. 7

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTGCGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CCGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln

OBR. 7 - pokr. 1

961 ATCATGGCCA GCGCCGTCGG CTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr
 1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGCCA GCGGCACCCAG CGTGGTGAAG GCGCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCGCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCGCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal

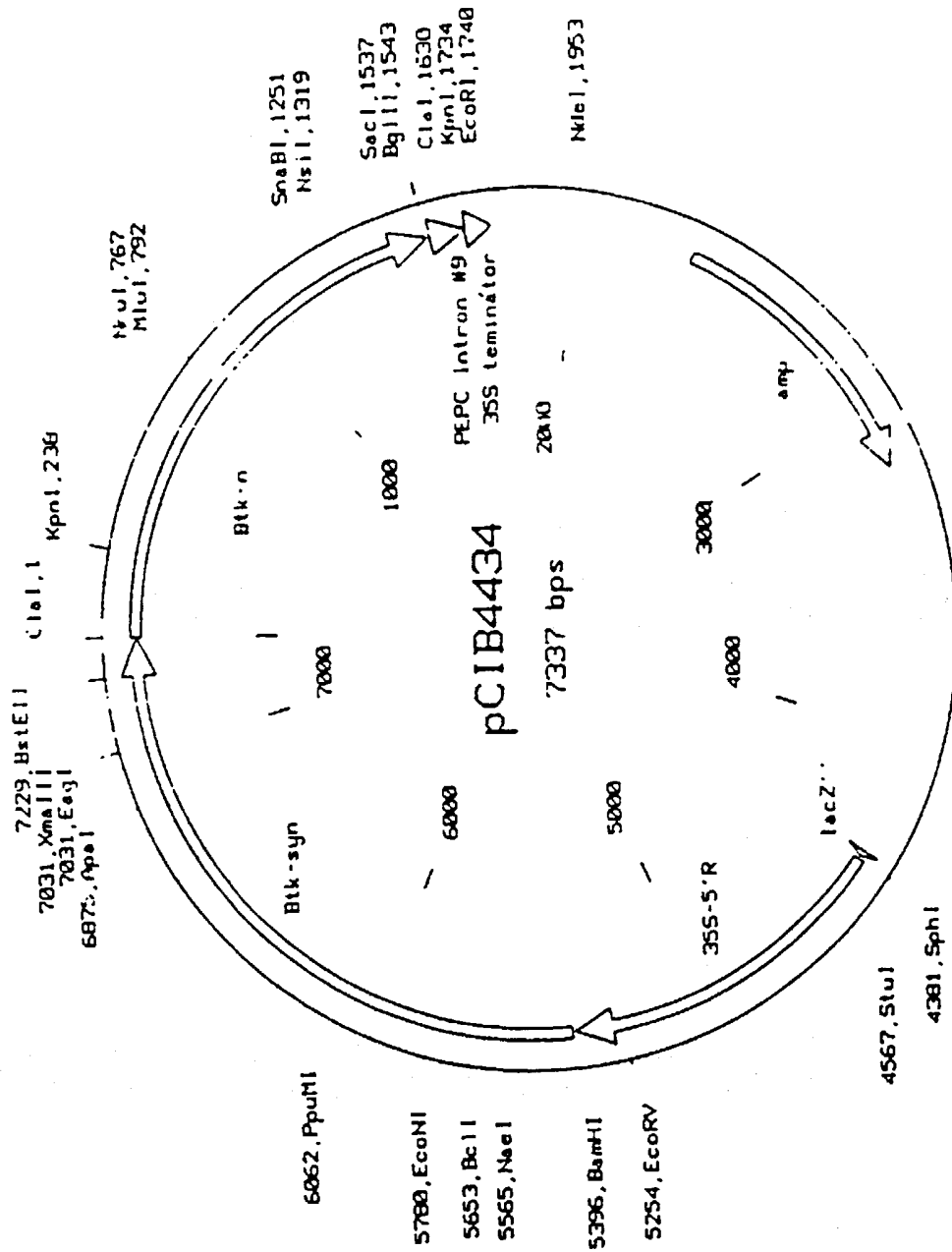
OBR. 7 - pokr. 2

1921 ACCGACTACC ACATCGAT/CA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTATCTGATGAATTTTGT
 ThrAspTyr HisIleAsp/GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu
 2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GCGGATGACG TATCAAAGA GAATTACGTT
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACCGTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGTTCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGAA AATGTGCCCA TCATTCCCAT
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysAla HisHisSerHis
 2401 CATTTCTCCT TGGACATTGA TGTTGGATGT ACAGACTTAA ATGAGGACTT AGGTGTATGG
 HisPheSer LeuAspIle AspValGlyCys ThrAspLeu AsnGluAsp LeuGlyValTrp
 2461 GTGATATTCA AGATTAAGAC GCAAGATGGC CATGCAAGAC TAGGAAATCT AGAATTTCTC
 ValIlePhe LysIleLys ThrGlnAspGly HisAlaArg LeuGlyAsn LeuGluPheLeu
 2521 GAAGAGAAAC CATTAGTAGG AGAAGCACTA GCTCGTGTGA AAAGAGCGGA GAAAAATGG
 GluGluLys ProLeuVal GlyGluAlaLeu AlaArgVal LysArgAla GluLysLysTrp
 2581 AGAGACAAAC GTGAAAAATT GGAATGGGAA ACAAATATTG TTTATAAAGA GGCAAAAGAA
 ArgAspLys ArgGluLys LeuGluTrpGlu ThrAsnIle ValTyrLys GluAlaLysGlu
 2641 TCTGTAGATG CTTTATTTGT AAACCTCTCA TATGATAGAT TACAAGCGGA TACCAACATC
 SerValAsp AlaLeuPhe ValAsnSerGln TyrAspArg LeuGlnAla AspThrAsnIle
 2701 GCGATGATTC ATGCGGCAGA TAAACGCGTT CATAGCATTG GAGAAGCTTA TCTGCCTGAG
 AlaMetIle HisAlaAla AspLysArgVal HisSerIle ArgGluAla TyrLeuProGlu
 2761 CTGTCTGTGA TTCCGGGTGT CAATGCGGCT ATTTTGAAG AATTAGAAGG GCGTATTTTC
 LeuSerVal IleProGly ValAsnAlaAla IlePheGlu GluLeuGlu GlyArgIlePhe
 2821 ACTGCATTCT CCCTATATGA TGCGAGAAAT GTCATTAAAA ATGGTGATTT TAATAATGGC
 ThrAlaPhe SerLeuTyr AspAlaArgAsn ValIleLys AsnGlyAsp PheAsnAsnGly

OBR. 7 - pokr. 3

2881 TTATCCTGCT GGAACGTGAA AGGGCATGTA GATGTAGAAG AACAAAACAA CCACCGTTCC
 LeuSerCys TrpAsnVal LysGlyHisVal AspValGlu GluGlnAsn AsnHisArgSer
 2941 GTCCTTGTTG TTCCGGAATG GGAAGCAGAA GTGTCACAAG AAGTTCGTGT CTGTCCGGGT
 ValLeuVal ValProGlu TrpGluAlaGlu ValSerGln GluValArg ValCysProGly
 3001 CGTGGCTATA TCCTTCGTGT CACAGCGTAC AAGGAGGGAT ATGGAGAAGG TTGCGTAACC
 ArgGlyTyr IleLeuArg ValThrAlaTyr LysGluGly TyrGlyGlu GlyCysValThr
 3061 ATTCATGAGA TCGAGAACAA TACAGACGAA CTGAAGTTTA GCAACTGTGT AGAAGAGGAA
 IleHisGlu IleGluAsn AsnThrAspGlu LeuLysPhe SerAsnCys ValGluGluGlu
 3121 GTATATCCAA ACAACACGGT AACGTGTAAT GATTATACTG CGACTCAAGA AGAATATGAG
 ValTyrPro AsnAsnThr ValThrCysAsn AspTyrThr AlaThrGln GluGluTyrGlu
 3181 GGTACGTACA CTTCTCGTAA TCGAGGATAT GACGGAGCCT ATGAAAGCAA TTCTTCTGTA
 GlyThrTyr ThrSerArg AsnArgGlyTyr AspGlyAla TyrGluSer AsnSerSerVal
 3241 CCAGCTGATT ATGCATCAGC CTATGAAGAA AAAGCATATA CAGATGGACG AAGAGACAA
 ProAlaAsp TyrAlaSer AlaTyrGluGlu LysAlaTyr ThrAspGly ArgArgAspAsn
 3301 CCTTGTTGAAT CTAACAGAGG ATATGGGGAT TACACACCAC TACCAGCTGG CTATGTGACA
 ProCysGlu SerAsnArg GlyTyrGlyAsp TyrThrPro LeuProAla GlyTyrValThr
 3361 AAAGAAATAG AGTACTTCCC AGAAACCGAT AAGGTATGGA TTGAGATCGG AGAAACGGAA
 LysGluLeu GluTyrPhe ProGluThrAsp LysValTrp IleGluIle GlyGluThrGlu
 3421 GGAACATTCA TCGTGGACAG CGTGGAATTA CTTCTTATGG AGGAATAA
 GlyThrPhe IleValAsp SerValGluLeu LeuLeuMet GluGlu---

OBR. 8



OBR. 9

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCC GGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTGGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAT
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCAGCG CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCCTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCCCA CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

OBR. 9 - pokr. 1

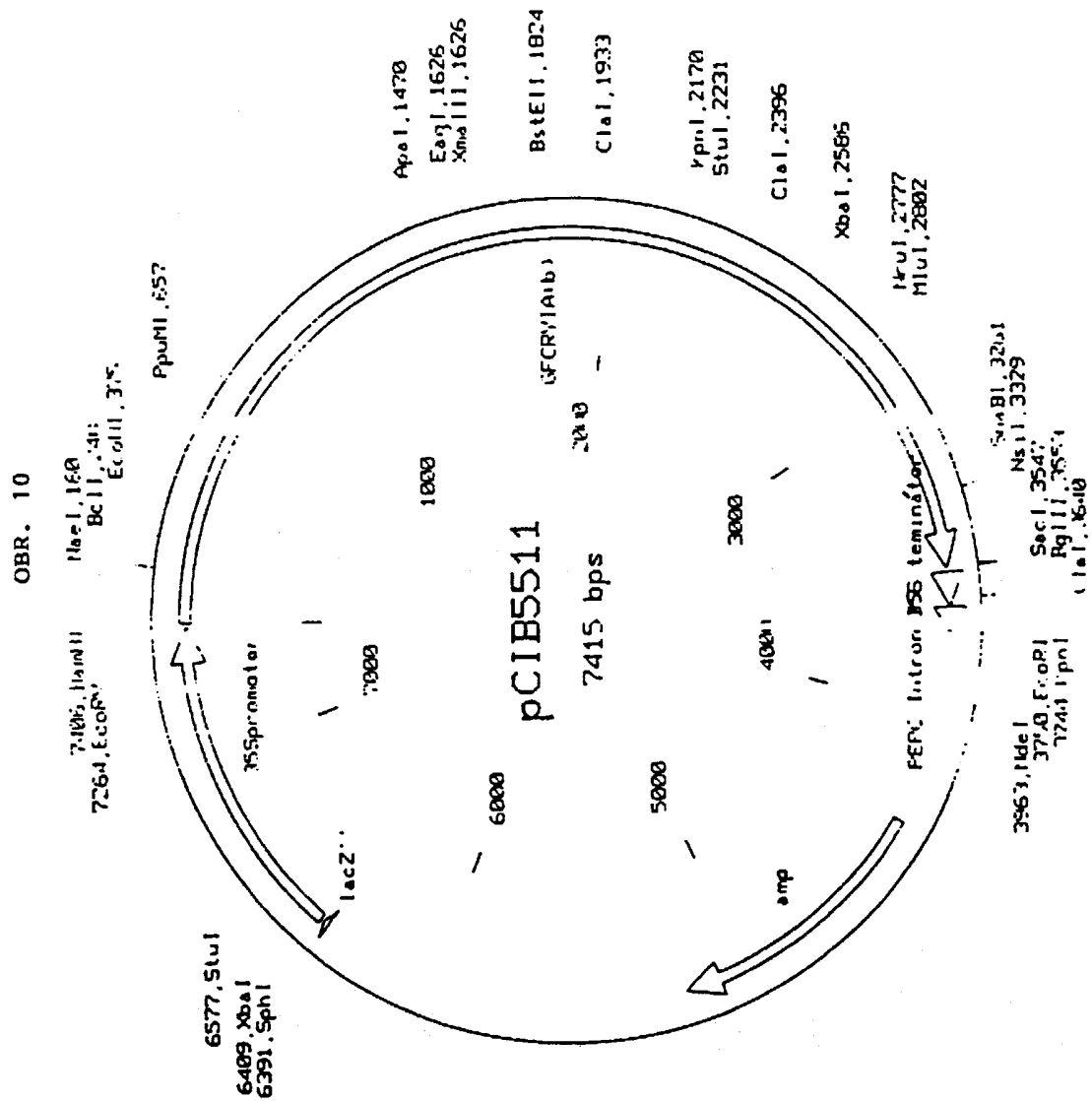
1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCGA CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCAG CCCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTTGT
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

OBR. 9 - pokr. 2

2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACGCTATTGG GTACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 CTGGAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGCAGCCTGT GGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TGGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TGGCCCCACC ACAGCCACCA CTTAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys
 2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TATAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATT
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTCTGA
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAAGCTTATC TGCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAAAACAACC ACCGTTCGGT CCTTGTGTGT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

OBR. 9 - pokr. 3

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
 ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
 3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
 GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
 3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGCC
 AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
 3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
 ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
 3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
 GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
 3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
 AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
 3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
 ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
 3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGAATTACT TCTTATGGAG
 GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
 3541 GAATAA
 Glu---



OBR. 11

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCC GGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCCGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAG
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTCCCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCCTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTGAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

OBR. 11 - pokr. 1

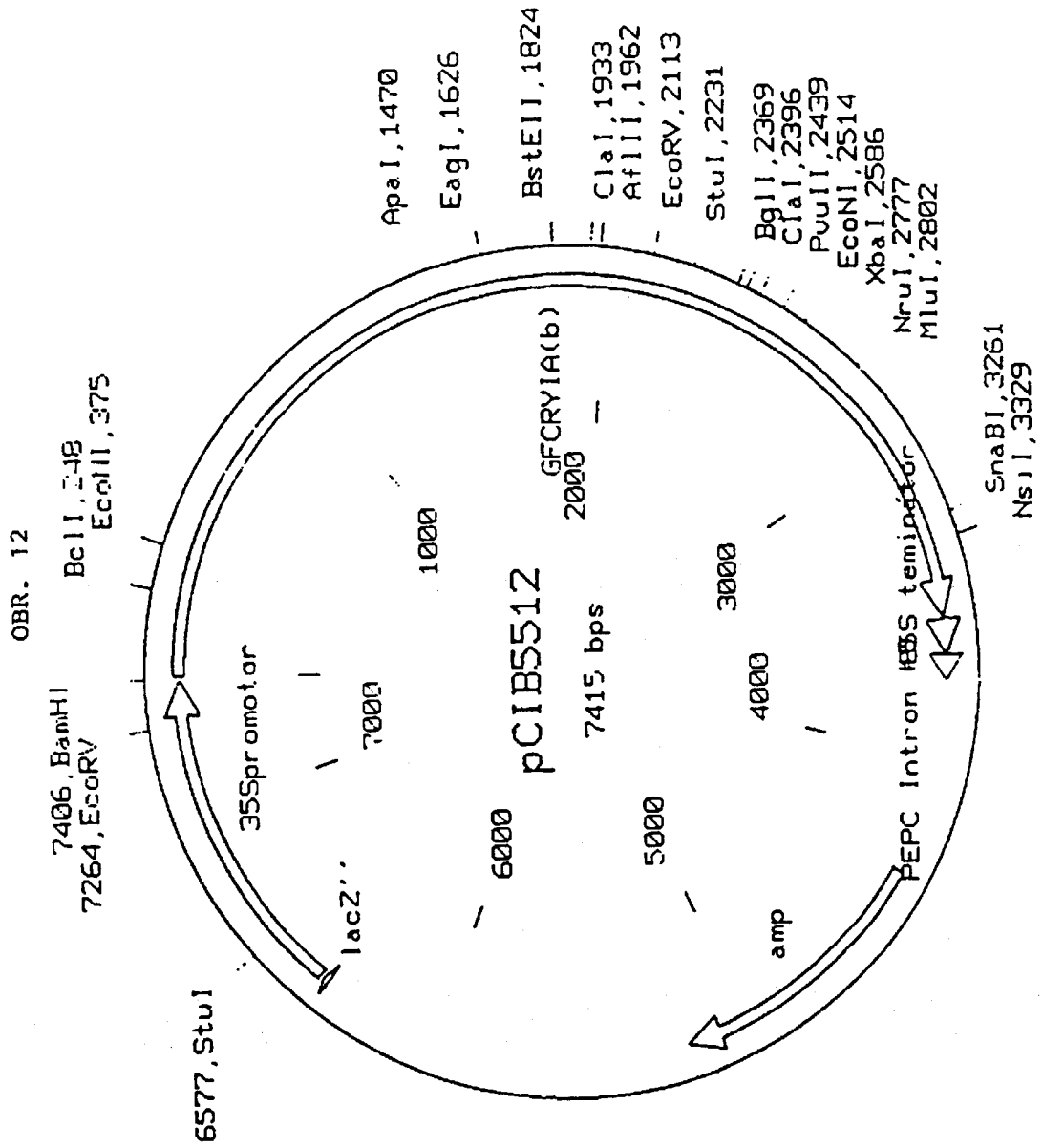
1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGGCCCGGCT TCACCGGCGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCGCCGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCCTGACC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCGCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCTTAAGCGA CGAGTTCTGC
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCAGC CCAAGCGCCT GAGCGACGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

OBR. 11 - pokr. 2

2041 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 CGAGGCAGCA CCGATATCAC CATCCAGGGC GGCGACGACG TGTTCAAGGA GAACTACGTG
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACCCTGCTGG GCACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 CTGGAAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCAGGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGCAGCCTGT GGCCCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCGA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TGCCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TGCGCCACC ACAGCCACCA CTTAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys
 2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGTAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTCTGA
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAAGAA
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CTTGTTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

OBR. 11 - pokr. 3

3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
 ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
 3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
 GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
 3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGCG
 AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
 3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
 ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
 3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
 GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
 3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
 AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
 3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
 ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
 3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGGAATTACT TCTTATGGAG
 GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
 3541 GAATAA
 Glu---



OBR. 13

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCGGCG CCGGCTTCGT GCTGGGCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCGCC GCGAGCTGAC CCGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGACCGTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCCGTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

OBR. 13 - pokr. 1

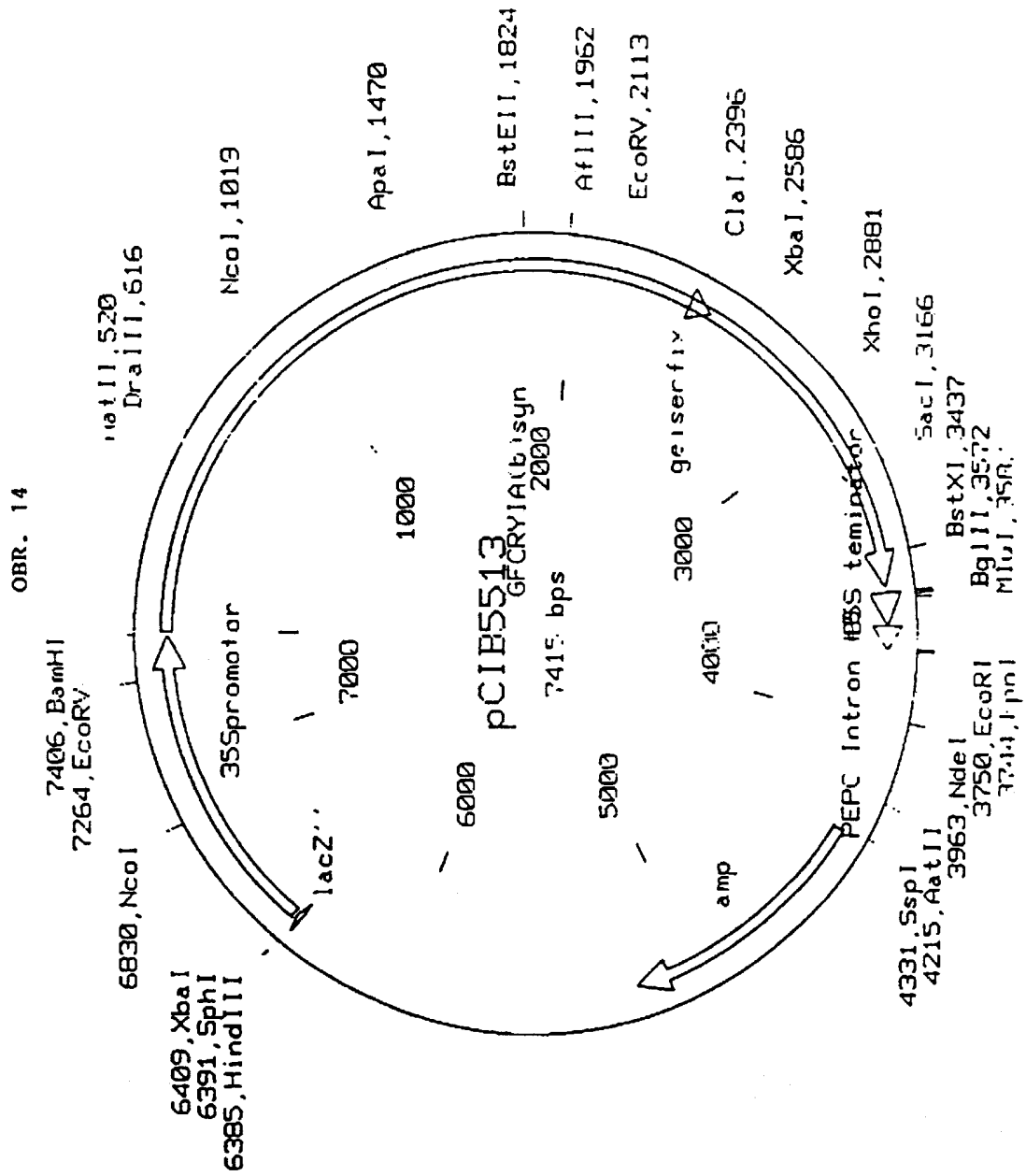
1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCTGTGA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGAG TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGGCG CGACATCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACC GC CCCCCTGAC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGGTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr PropheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA GGTGAGCAAC CTGGTGGAGT GCTTAAGCGA CGAGTTCTGC
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGACGAGA AGAAGGAGCT GAGCGAGAAG GTGAAGCACG CCAAGCGCCT GAGCGACGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

OBR. 13 - pokr. 2

2041 CGCAACCTGC TGCAGGACCC CAACTTCCGC GGCATCAACC GCCAGCTGGA CCGCGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 CGAGGCAGCA CCGATATCAC CATCCAGGGC GGCGACGACG TGTTCAGGA GAACTACGTG
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACCCTGCTGG GCACCTTCGA CGAGTGCTAC CCCACCTACC TGTACCAGAA GATCGACGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 AGCAAGCTGA AGGCCTACAC CCGCTACCAG CTGCGCGGCT ACATCGAGGA CAGCCAGGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 CTGGAAATCT ACCTGATCCG CTACAACGCC AAGCACGAGA CCGTGAACGT GCCCGGCACC
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGCAGCCTGT GGCCCTGAG CGCCCCCAGC CCCATCGGCA AGTGCGGGGA GCCGAATCCA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TGCCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TGCGCCACC ACAGCCACCA CTTGAGCCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGCAATCTAG AGTTCCTGGA GGAGAAGCCC CTGGTGGGCG AGGCCCTGGC CCGCGTGAAG
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys
 2641 CGCGCCGAGA AGAAGTGGCG CGACAAGCGC GAGAAGCTGG AGTGGGAGAC CAACATCGTG
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TACAAGGAGG CCAAGGAGAG CGTGGACGCC CTGTTCTGTA ACAGCCAGTA CGACCGCCTG
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAGGCCGACA CCAACATCGC CATGATCCAC GCCGCCGACA AGCGCGTGCA CAGCATTCCG
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAGGCCTACC TGCCCGAGCT GAGCGTGATC CCCGGCGTGA ACGCCGCCAT CTTGAGGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 CTCGAGGGCC GCATCTTCAC CGCCTTCAGC CTGTACGACG CCCGCAACGT GATCAAGAAC
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGCGACTTCA ACAACGGCCT GAGCTGCTGG AACGTGAAGG GCCACGTGGA CGTGGAGGAG
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAGAACAACC ACCGCAGCGT GCTGGTGGTG CCCGAGTGGG AGGCCGAGGT GAGCCAGGAG
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

OBR. 13 - pokr. 3

3061 GTGCGCGTGT GCCCCGGCCG CGGCTACATC CTGCGCGTGA CCGCCTACAA GGAGGGCTAC
 ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
 3121 GGCGAGGGCT GCGTGACCAT CCACGAGATC GAGAACAACA CCGACGAGCT CAAGTTCAGC
 GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
 3181 AACTGCGTGG AGGAGGAGGT GTACCCCAAC AACACCGTGA CCTGCAACGA CTACACCGCG
 AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
 3241 ACCCAGGAGG AGTACGAGGG CACCTACACC AGCCGCAACC GCGGCTACGA CGGCGCCTAC
 ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
 3301 GAGAGCAACA GCAGCGTGCC CGCCGACTAC GCCAGCGCCT ACGAGGAGAA GGCCTACACC
 GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
 3361 GACGGCCGCC GCGACAACCC CTGCGAGAGC AACC GCGGCT ACGGCGACTA CACCCCCCTG
 AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
 3421 CCCGCCGGCT ACGTGACCAA GGAGCTGGAG TACTTCCCCG AGACCGACAA GGTGTGGATC
 ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
 3481 GAGATCGGCG AGACCGAGGG CACCTTCATC GTGGACAGCG TGGAGCTGCT GCTGATGGAG
 GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
 3541 GAGTAG
 Glu---



OBR. 15

1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGGC CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCGCA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGCGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCCGCC GCGAGCTGAC CCTGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCAACTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCCTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCAC CGCGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCGTCGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr

OBR. 15 - pokr. 1

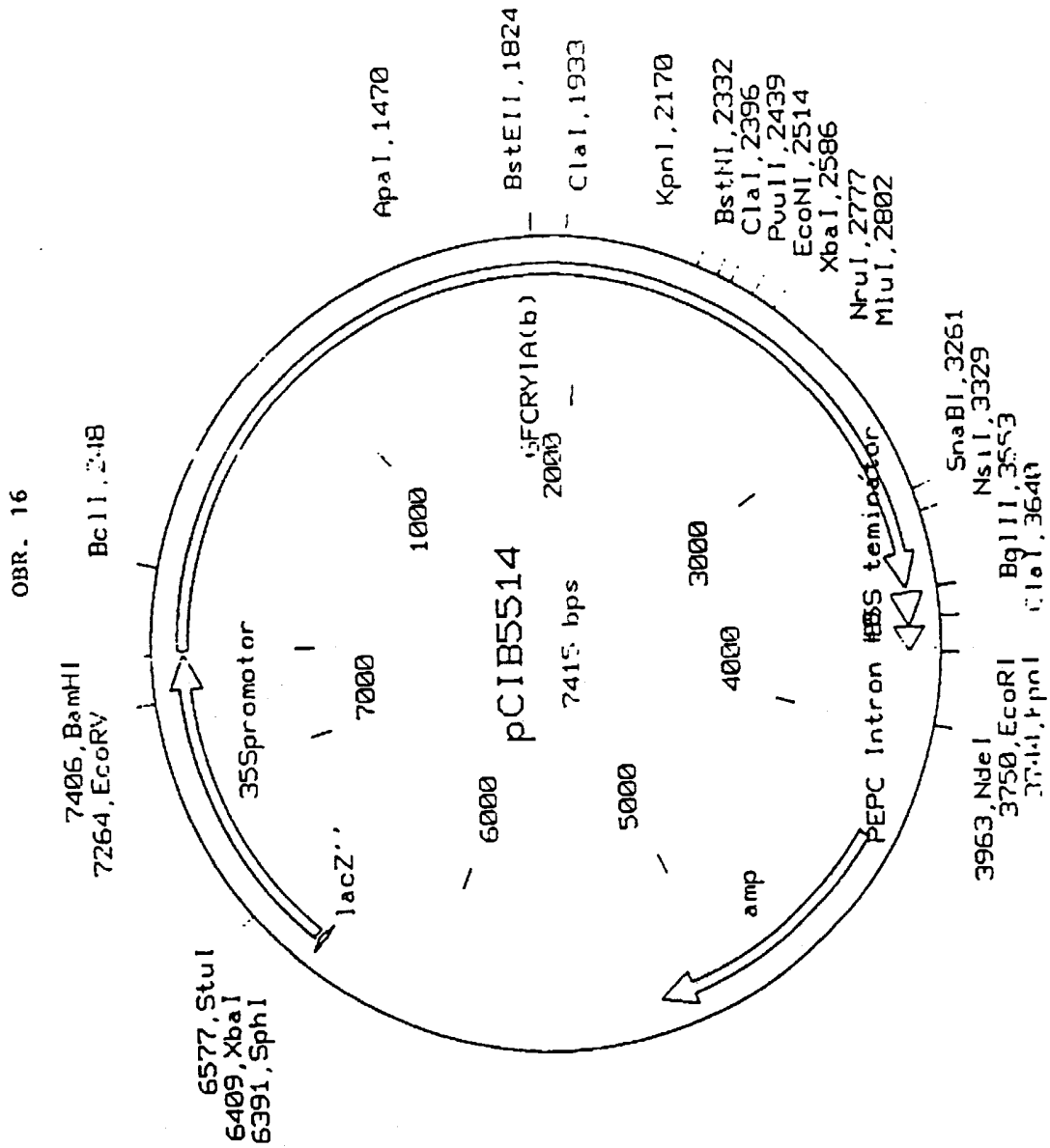
1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTACCGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal
 1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCGG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCAGCA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGGCG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCCG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTTGT
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGATGAAA AAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu

OBR. 15 - pokr. 2

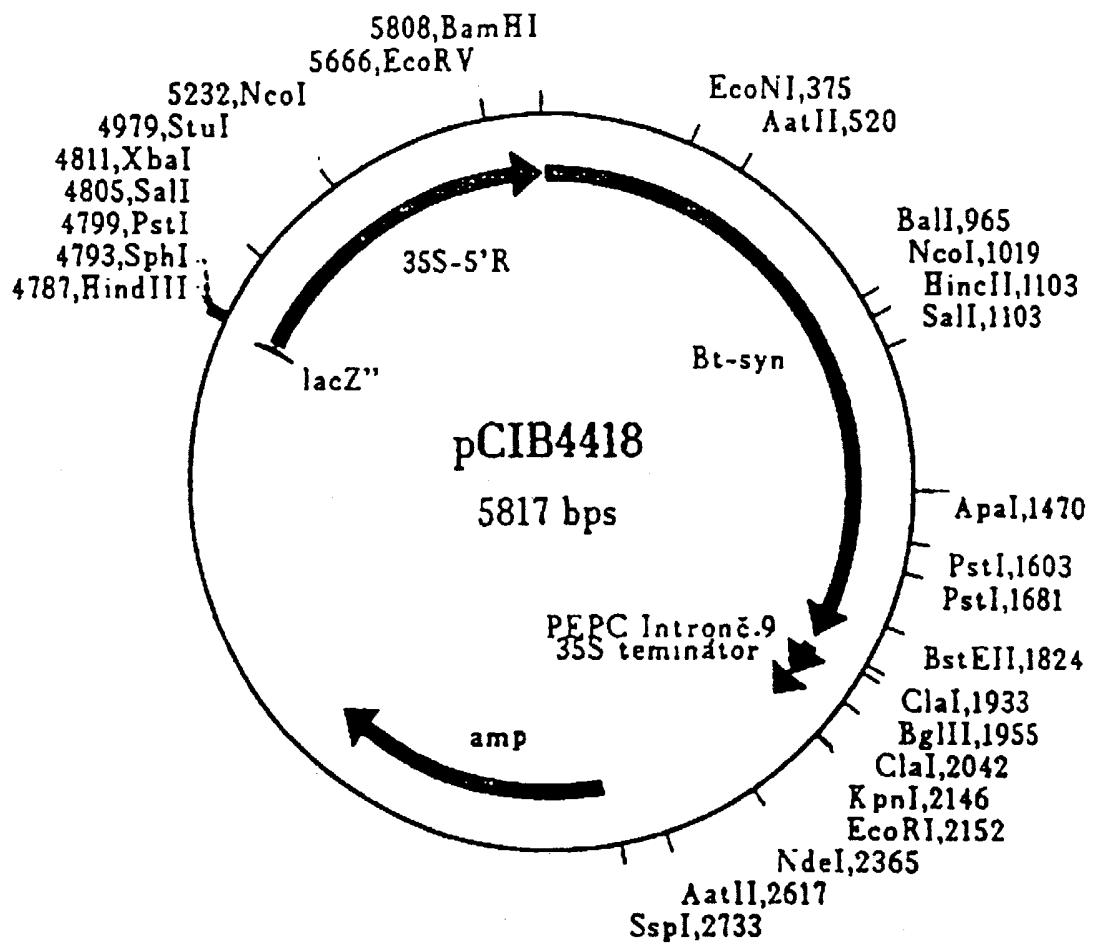
2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACCTTTAGA GGGATCAATA GACAACCTAGA CCGTGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACAATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGTTCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGCA AGTGCAGGGA GCCGAATCGA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TCGGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TCGCCCCACC ACAGCCACCA CTTACGCTG GACATCGACG TGGGCTGCAC CGACCTGAAC
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACCTGG GCGTGTGGGT GATCTTCAAG ATCAAGACCC AGGACGGCCA CGCCCGCCTG
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGCAATCTAG AATTTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCSTGTGAAA
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys
 2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TGATAGTGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACGCGTTCA TAGCATTCTGA
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTC AATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAAGAAGAA
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CTTGTTGTT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu

OBR. 15 - pokr. 3

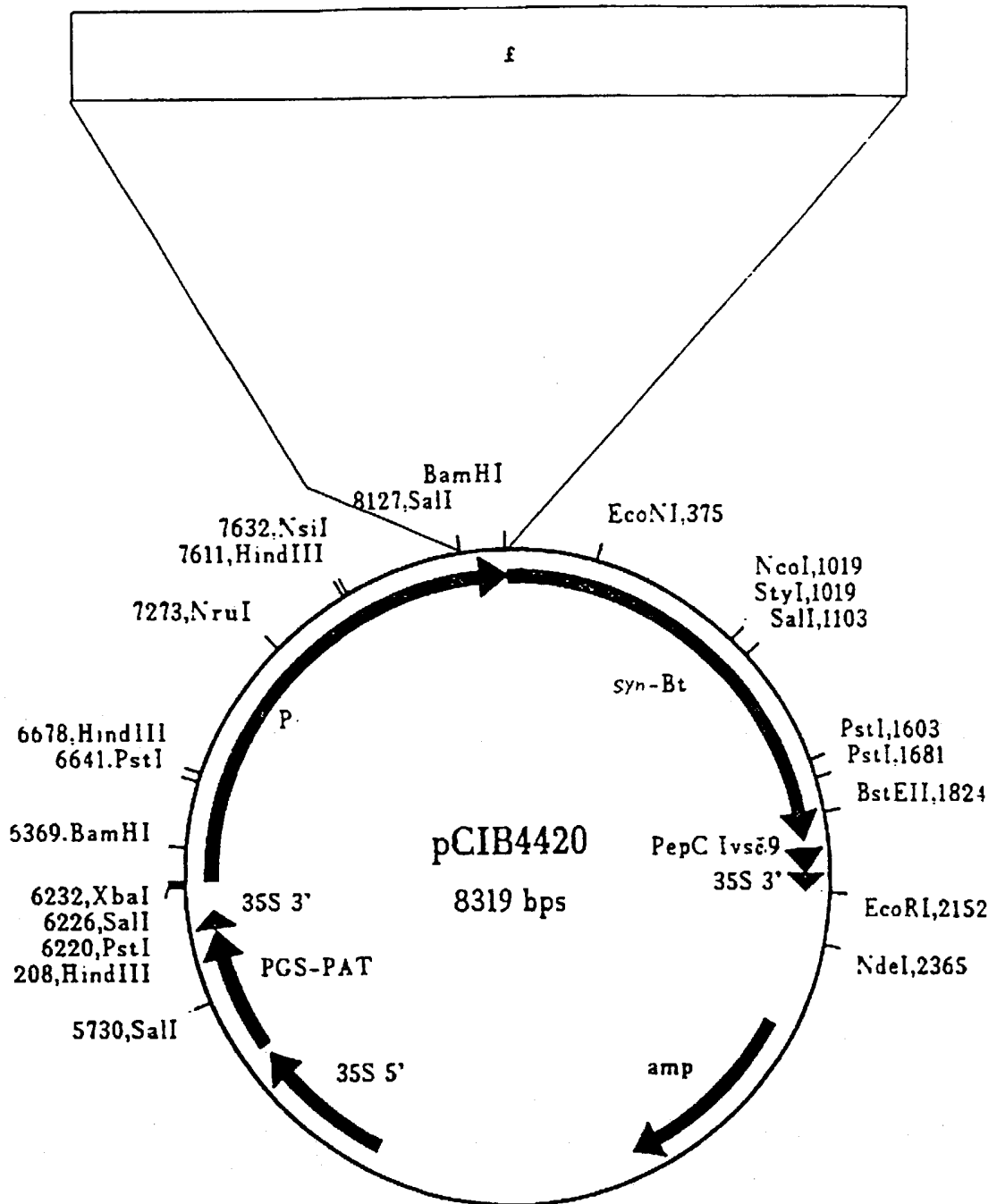
3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCG TGGCTATATC CTTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
 ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
 3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAACT GAAGTTTAGC
 GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
 3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGCG
 AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
 3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
 ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
 3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
 GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
 3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
 AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
 3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
 ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
 3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTATC GTGGACAGCG TGGAATTACT TCTTATGGAG
 GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
 3541 GAATAAG
 Glu---

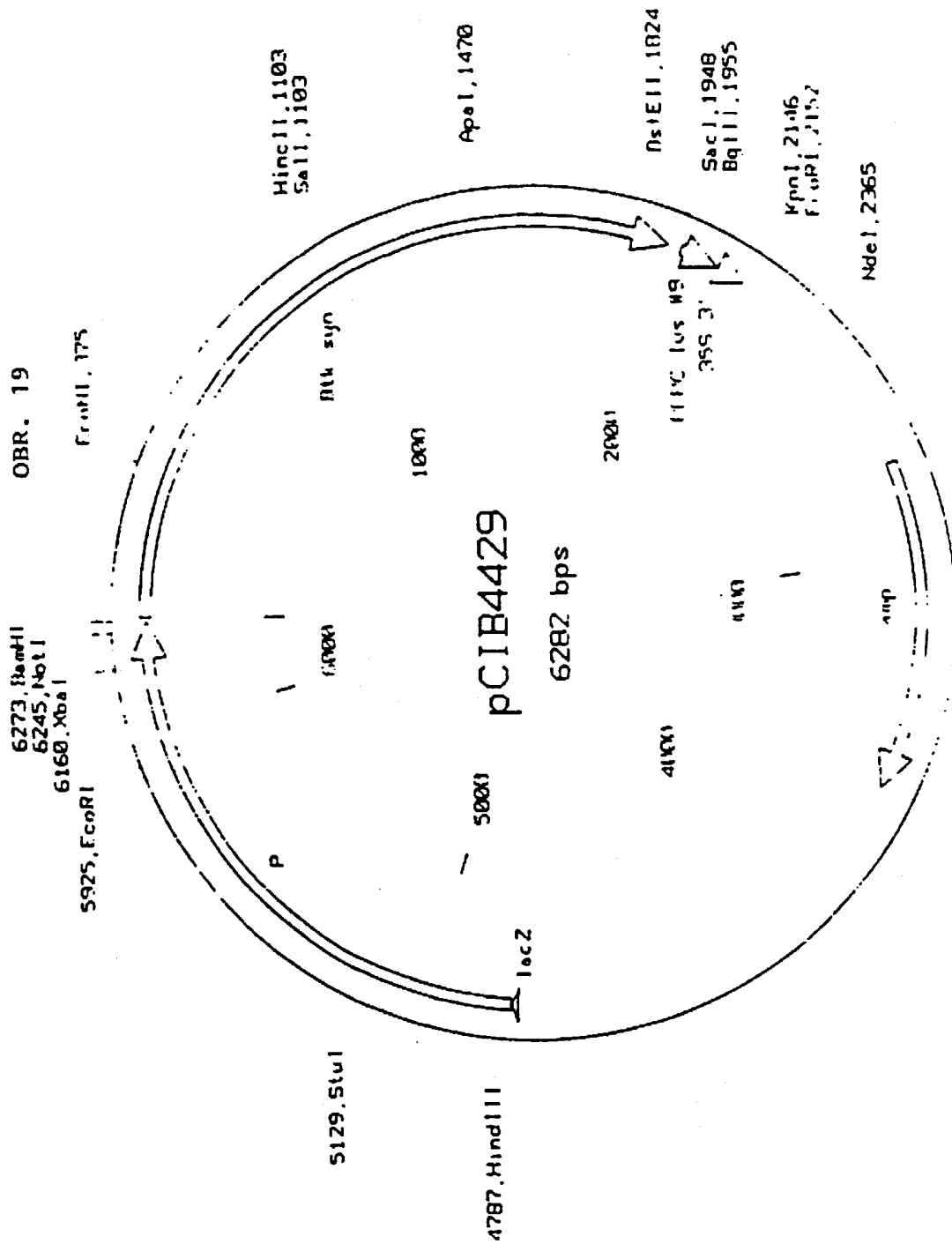


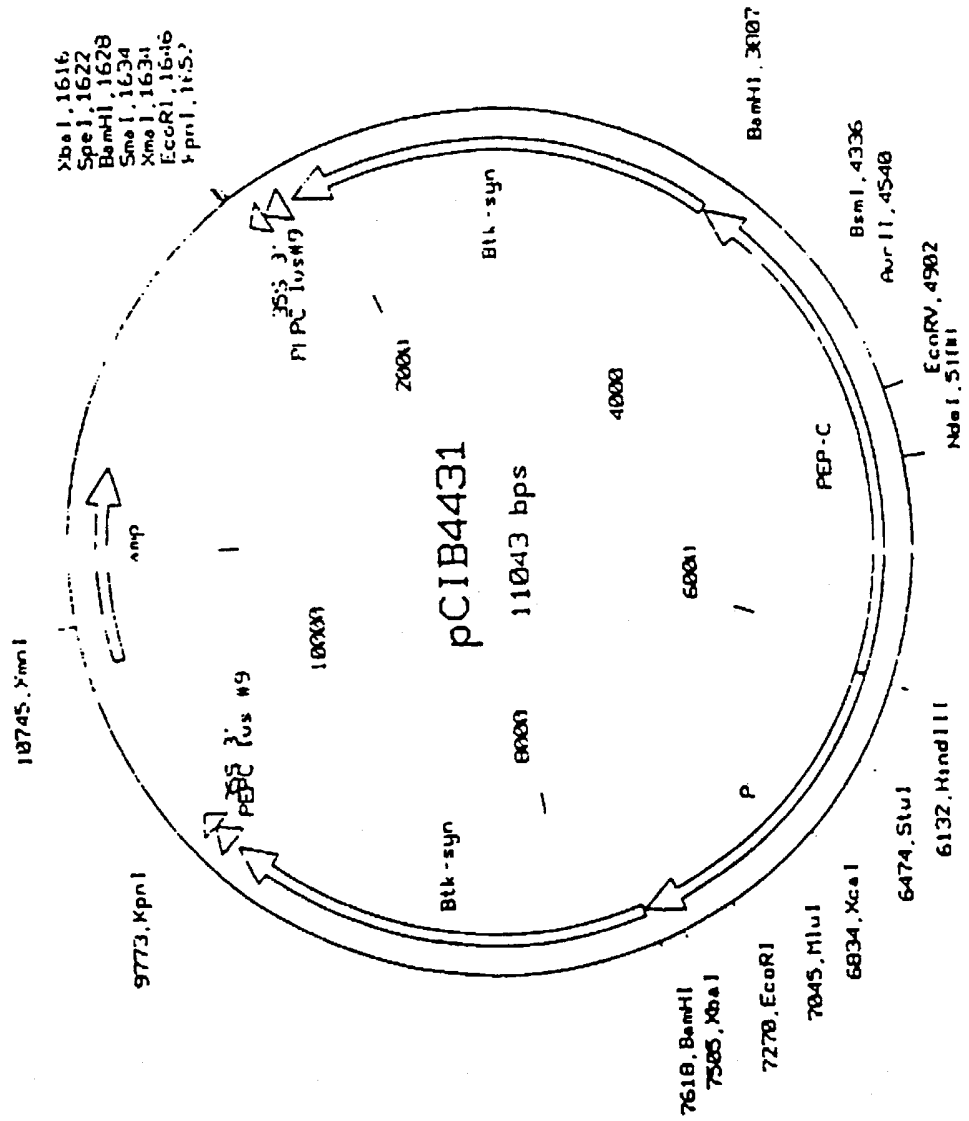
OBR. 17



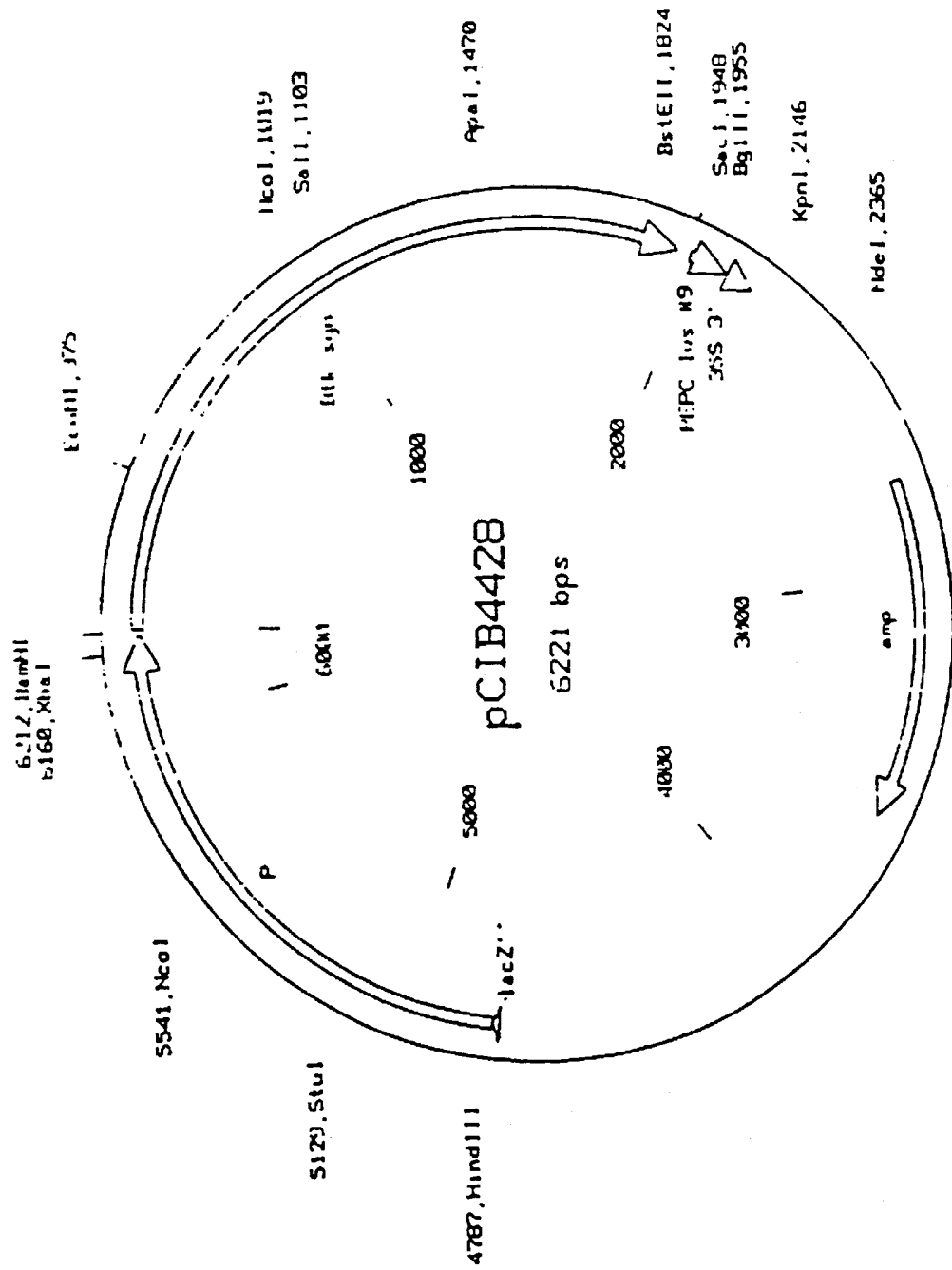
OBR. 18



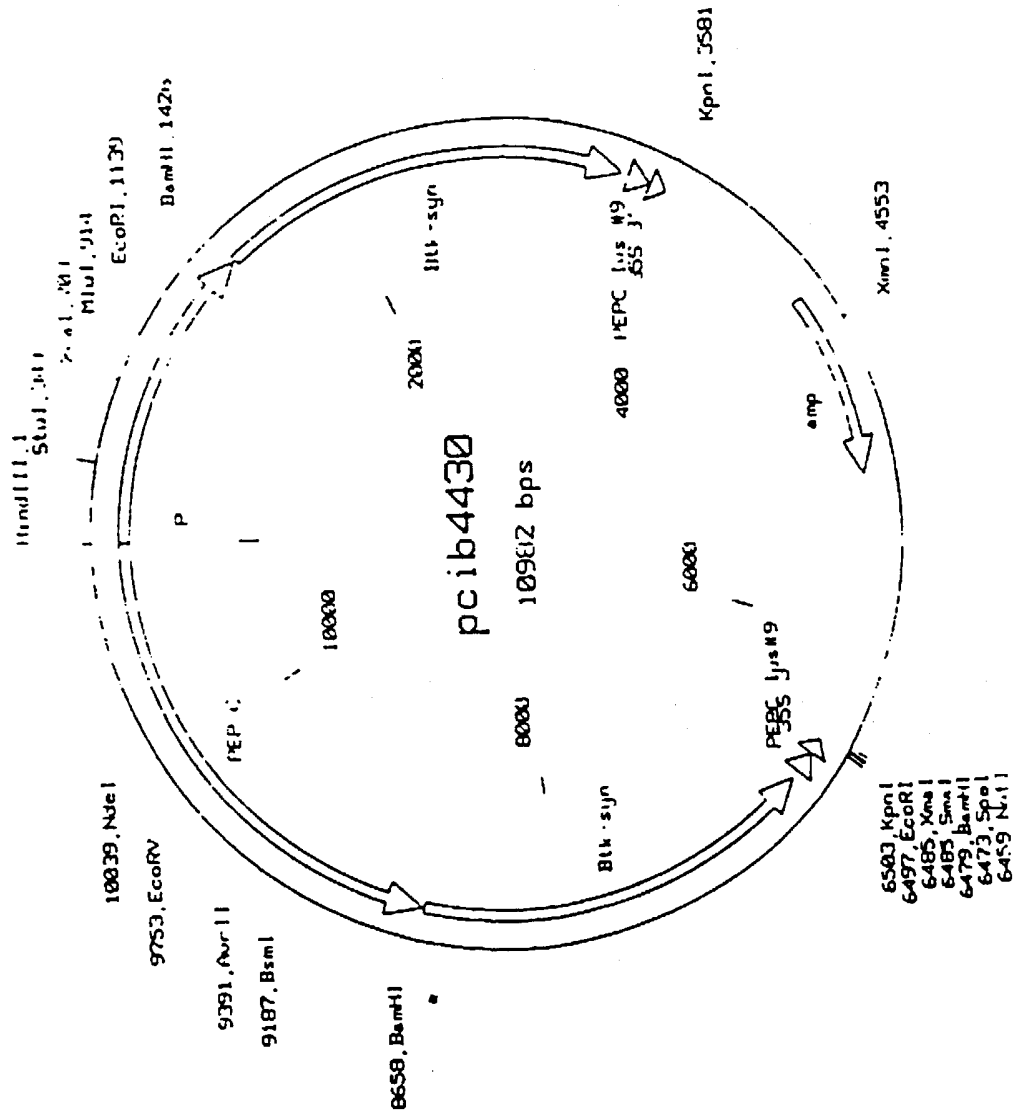




OBR. 21



ORR. 22



OBR. 23A

I x P	ABRU č.	m
2ND01X171-4A	1646	29
5N984X171-4A	857	1705
5N984X171-4A	870	1760
5N984X171-13	969	22
5N984X171-15	1468	17
5N984X171-15	1470	28
5N984X171-14A	1502	180
5N984X171-14A	1529	1500
5N984X176-11	1667	408
5N984X176-11	1671	1270
5N984X176-11	1673	1522
5N984X176-11	1675	943
5N984X176-11	1679	967
5N984X171-4B	1942	15
5N984X171-4B	1946	16
5NA56X171-16ABX	1101	30
5NA89X176-11	1622	959
5NA89X176-11	1630	1172
5NA89X176-11	1635	1100
6F010X171-4	825	103
6F010X171-4	832	1298

OBR. 23B

plazmid	promotor	křížení	rostlina č.	gen Bt	procento mortality	
					Ostrinia	Diatraea
pCIB4431	PEPC	5N984 X 176-88	21	+	100	100
			22		0	0
			40	+	100	100
pCIB4431	PEPC	5N984 X 176-11	95	+	100	100
			96		0	0
			98	+	100	100
pCIB4418	3SS	5N984 X 171-14A	45		0	10
			64	+	100	90
			68	+	100	100
pCIB4431	PEPC	2N217AF X 175-88	1	+	0	0
			3	+	100	100
			4	+	100	100
pCIB4418	3SS	2N217AF X 171-15	70	+	10	0
			83	+	90	80
			88	+	90	100

OBR. 23C

linie 35S	list	dřeň	kořen	pyl
6F010 x 171-4A	409 + 288	NT	NT	NT
5N984 x 171-14A	256 + 159	191	198	30
6F010 x 171-16AB	240 + 174	221	271	NT
5N984 x 171-13	201 + 94	NT	NT	NT
5NA89 x 171-13	37 + 7	150	0	NT
5N984 x 171-18	7.7 + 3	NT	NT	NT
6N615 x 171-16AB	7.5 + 3	0	0	
linie PEPC				
6N615 x 176-11	1125 + 419	41	19	NT
6F010 x 176-10	774 + 159	NT	NT	130
5N984 x 176-11	719 + 128	16	20	186

OBR. 23D

plazmid	promotor	případ	rostlina č.	procento mortality
pCIB4433	ařeňový	JS21A-Top	1	90
			3	80
			11	90
			13	70
			14	75
			19	85
			28	80
pCIB4433	ařeňový	JS21D-Mid	3	70
			4	65
			7	85
			17	95
		kontrola	1	5
			2	0
			3	0

OBR. 23E

č	M
JS21A-1 TOP	169
JS21A-2 TOP	0
JS21A-3 TOP	113
JS21A-11 TOP	127
JS21A-12 TOP	112
JS21A-13 TOP	97
JS21A-14 TOP	118
JS21A-19 TOP	82
JS21A-24 TOP	0
JS21A-28 TOP	154
JS22D-3 MID	2946
JS22D-4 MID	5590
JS22D-11 MID	215
JS22D-17 MID	3004

OBR. 24

1	GAATTCGGATCCATTAAAGAAGTCTTTGAACAGATTCTAGAGATCTAGTTTAATGAGCTC	60
61	CCAAAAGTCTTGAAAAAATTCAGCGGGGAGGCCATTAGGGCAGGGGTACTGTTATGTTTT	120
121	AAAGAGAACACCACTTTCTTGATCTCTTCTAAAGAGAAATGTTTTGTAAGAAGGATCCTG	180
181	TCCTCCTCATCCAACCTTTTCATCGGCAAATTTTTCATAGAGATATTAGAGGCAAGAGAG	240
241	GGGCCAAAAAGATCCATGTAAATGGAAGTGGCCACCTGGTTGATACCTCCCTCATCTTCA	300
301	ACAGAAAATCCATTATGAAAAAGTGAATGGATTTTAAACTCTTCTTTTCTCCCTTTTG	360
361	CAATGAGCTGAAAATATCTGGTATTATTCTCATCACCCCTCATTAAATGAATCTGTCCCTAG	420
421	CAATTTGCTTTTCTCTTGATCCCTTCTGCAGCCACCATGTTTCTTAAATTCCACTCCATAT	480
481	CAAGCTTTTCCAATCTATCAGAATCTGAGATGGCTGCAATCTCTCTCATTTTCTCAAGGA	540
541	TATCGATGTTATCCATAAGGTATTTCTTGAACCTCTTATATTTCCCTTCGACATTTATAT	600
601	TCCATCCTTTCAACATTTTTTTGTTCAATCTTTTTTGTTTTTTCTTTTCCAAACATCGA	660
661	TACATTTCTGCTCCTCACAGGTAAGGACGAGCTTTCAAAAAACCTTCTGCTTTAAAGTC	720
721	AGGTCTGAGCCTCCAGCAAAGCTCACATATCTAAAGTCCCTCTTCTTAGTTGGGACAGAG	780
781	TCAGTGCTAAGACACATGGGAACATGACCAGAAAAAAAATCATATTTAGCCCAGAGAC	840
841	AACAAATATTCTTGTAAGTCTCGTTATGGGCTAGCAAAGGAATCTACCCAACTTCT	900
901	CAATGTGTGGGATGTCAAGTATATAGACTATTTCATCAGTTCCAACTCTATCAAAGTGT	960
961	GCAGCTCAATTATAGAGTTGAATAAAGTGTCCATCTATTTGTTCTTATCCTCATATTTG	1020
1021	GTTAAGATATTAATAACACCTCCCACCAACATTTAAAGTGCACCAITTTAAAGTGGCTCGC	1080
1081	GAGCACCAAACCGCTGAAAACCGGAAATGTTTAGCACGTTGGCAGCGGGACCCCTTTTCTA	1140
1141	TCTCATCGTGTCTTCTGTTGTCCACCACGGCCACGGGCCAACGCTCCTCCATCCTGTAG	1200
1201	TGTAGAGTATATTCCATTTGCGACCGAGCCGAGCATCGATCCAGCCACACTGGCCACTGC	1260
	84	
1261	CAGCCAGCCATGTGGCACTCCTACGTATACTACGTGAGGTGAGATTCACTCACATGGGAT	1320
-465		-405
1321	GGGACCGAGATATTTTACTGCTGTGGTTGTGTGAGAGATAATAAGCATTATGACGATT	1380
1381	GCTGAACAGCACACACCATGCGTCCAGATAGAGAAAGCTTTCTCTCTTTATTCGCATGCA	1440
1441	TGTTTCATTATCTTTTATCATATATATATAACACATATTAAATGATTCTTCGTTCCAATT	1500
-285		-225
1501	TATAATTCATTGACTTTTTTATCCACCGATGCTCGTTTTATTAAAAAAAATATTATAAT	1560
-225		-166
1561	TATTGTTACTTTTTGTTGTAATATTGTTTAGCATATAATAAACTTTGATACTAGTATGTT	1620
-165		-106
	49	
1621	TCCGAGCAAAAAAATATTAATATTTAGATTACGAGGCCCATTAATTATATATTCGAG	1680
-105		-46
	83	
	+1	
1681	ACAAGCGAAGCAAAGCAAAGCAAAGCTAATGTTGCCCTGCTGTGCATGCAGAGGCCCGCT	1740
-45		+15
	73*****	
1741	CTTGCTATAAACGAGGCAGCTAGACGCGACTCGACTCATCAGCCTCATCAACCTCGACGA	1800
+16		+75

	1	
1801	AGGAGGAACGAACGGACAGGTTGTTGCACAGAAGCGACATGGCTTTTCGCGCCCAAAACGT	1860
+76		+135
	M A F A P K T S	

38

OBR. 24 - pokr. 1

1861	<u>CCTCCTCCTCCTCGCTGTCTCGGGCGTTGCAGGCAGCTCAGTCGCCGCCGCTGCTCCTGA</u>	1920
+126	S S S S L S S A L Q A A Q S P P L L L R	+195
1921	GGCGGATGTCGTCGACCGCAACACCGAGACGGAGGTACGACGC <u>GGCCGTCGTCGTCACCTA</u>	1980
+196	R M S S T A T P R R R Y D A A V V V T T	+255
1981	<u>CCACCACCACTGCTAGAGCTGCGGGCGGCTGCTGTACCGGTTCCCGCCGCCCGCCGCGAGG</u>	2040
+256	T T T A R A A A A A V T V P A A P P Q A	+315
2041	CGGGCCGCCGCCGCCGGTGCCACCAAAGCAAGCGGCGG <u>CACCCGCAGAGGAGGAGCGGTC</u>	2100
+316	G R R R R C H Q S K R R H P Q R S R P	+375
2101	CGGTGTCGGACACCATGGCGGCGCTCATGGCCAAGGGCAAGGTTCTGTATAGTACGCGCGC	2160
+376	V S D T M A A L M A K G K	
2161	GTGTCGTCGTCGTTATTTTGGCGCATAGGCGCGGACATACACGTGCTTTAGCTAGCTAACA	2220
2221	GCTAGATCATCGGTGCAGACGGCGTTTCATCCCGTACATCACCGCCGGCGACCCGGACCTA	2280
	T A F I P Y I T A G D P D L	
2281	GCGACGACGGCCGAGGCGCTGCGTCTGCTGGACGGCTGTGGCGCCGACGTCATCGAGCTG	2340
	A T T A E A L R L L D G C G A D V I E L	
2341	GGGGTACCCTGCTCGGACCCCTACATCGACGGGCCCATCATCCAGGCGTCGGTGGCGCGG	2400
	G V P C S D P Y I D G P I I Q A S V A R	
2401	GCTCTGCCAGCGGCACCACCATGGACGCCGTGCTGGAGATGCTGAGGGAGGTGACGCCG	2460
	A L A S G T T M D A V L E M L R E V T P	
2461	GAGCTGTCGTGCCCCGTGGTGCTCCTCTCCTACTACAAGCCCATCATGTCTCGCAGCTTG	2520
	E L S C P V V L L S Y Y K P I M S R S L	
2521	GCCGAGATGAAAGAGGCGGGGTCCACGGTAACCTATAGCTAGCTCTTCCGATCCCCCTTC	2580
	A E M K E A G V H	
2581	AATTAATTAATTTATAGTAGTCCATTTCATGTGATGATTTTTGTTTTCTTTTACTGACA	2640
2641	GGTCTTATAGTGCCTGATCTCCCGTACGTGGCCGCGCACTCGCTGTGGAGTGAAGCCAAG	2700
	G L I V P D L P Y V A A H S L W S E A K	
2701	AACAACAACCTGGAGCTGGTAGGTTGAATTAAGTTGATGCATGTGATGATTTATGTAGCT	2760
	N N N L E L	
2761	AGATCGAGCTAGCTATAATTAGGAGCATATCAGGTGCTGCTGACAACACCAGCCATACCA	2820
	V L L T T P A I P	
2821	GAAGACAGGATGAAGGAGATCACCAAGGCTTCAGAAGGCTTCGTCTACCTGGTAGTTATA	2880
	E D R M K E I T K A S E G F V Y L	
2881	TGTATATATAGATGGACGACGTAACCTCATTCCAGCCCCATGCATATATGGAGGCTTCAAT	2940
2941	TCTGCAGAGACGACGAAGACCACGACGACGACTAACACTAGCTAGGGGCGTACGTTGCAG	3000
3001	GTGAGCGTGAACGGAGTGACAGGTCTCGCGCAAACGTGAACCCACGAGTGGAGTCACTC	3060
	V S V N G V T G P R A N V N P R V E S L	

OBR. 24 - pokr. 2

3061	ATCCAGGAGGTTAAGAAGGTGACTAACAAGCCCGTTGCTGTTGGCTTCGGCATATCCAAG	3120
	I Q E V K K V T N K P V A V G F G I S K	
3121	CCCGAGCACGTGAAGCAGGTACGTACGTAGCTGACCAAAAAAACTGTTAACAAGTTTGG	3180
	P E H V K	
3181	TTTGACAAGCCGGCTACTAGCTAGCTAACAGTGATCAGTGACACACACACACACAGAT	3240
	Q I	
3241	TGCGCAGTGGGGCGCTGACGGGGTGATCATCGGCAGCGCCATGGTGAGGCAGCTGGGCGA	3300
	A Q W G A D G V I I G S A M V R Q L G E	
3301	AGCGGCTTCTCCCAAGCAAGGCCTGAGGAGGCTGGAGGAGTATGCCAGGGGCATGAAGAA	3360
	A A S P K Q G L R R L E E Y A R G M K N	
	+++	
3361	CGCGCTGCCATGAGTCCATGACAAAGTAAACGTACAGAGACACTTGATAATATCTATCT	3420
	A L P	
3421	ATCATCTCGGAGAAGACGACCGACCAATAAAAAATAAGCCAAGTGGAAGTGAAGCTTAGCT	3480
3481	GTATATACACCGTACGTGCTGCTGCTGCTGCTTCCGGATCGATCTCGGCCGGCTAGCTAGCAG	3540
3541	AACGTGTACGTAGTAGTATGTAATGCATGGAGTGTGGAGCTACTAGCTAGCTGGCCGTTTC	3600
3601	ATTCGATTATAATTCTTCGCTCTGCTGTGGTAGCAGATGTACCTAGTCGATCTTGTACGA	3660
3661	CGAAGAAGCTGGCTAGCTAGCCGTCTCGATCGTATATGTACTGATTAATCTGCAGATTGA	3720
	\$	
3721	ATAAAAACTACAGTACGCATATGATGCGTACGTACGTGTGTATAGTTTGTGCTCATATAT	3780
3781	GCTCCTCATCACCTGCCTGATCTGCCCATCGATCTCTCTCGTACTCCTTCCTGTAAATG	3840
3841	CCTTCTTTGACAGACACACCACCAGCAGTACGCTCTGCACGCCGCCGCTTTAA	3900
3901	GACATGTAAGATATTTTAAGAGGTATAAGATACCAAGGAGCACAAATCTGGAGCACTGGG	3960
3961	ATATTGCAAAGACAAAAAAAACAAAATTAAGTCCCACCAAAGTAGAGATAGTAAAGA	4020
4021	GGTGGATGGATTAAATATCTCATGATTTTTGGATCTGCTCAAAATAGATCGATATGGTA	4080
4081	TTCAGATCTATGTTGTATAGCCTTTTCATTAGCTTTCTGAAAAAAAATGGTATGATGAG	4140
4141	TGCGGAGTAGCTAGGGCTGTGAAGGAGTCGGATGGGCTTCCACGTACTTGTGTGGCCC	4200
4201	TAGTCCGGTTCTATTTAGGTCCGATCCGAGTCCGGCATGGTCCGGTTCCATACGGGCTAG	4260
4261	GACCAAGCTCGGCACGTGAGTTTtagggccgctcggttagcccgagcagaccgcttttta	4320
4321	AACGGCTAGGACTCGCCCATTTAATAAGACAAACATTGCAAAAAATAGCTCTATTTTTT	4380
4381	ATTTAAATATATTGTTTATTTGTGAAATGTGTATTATTTGTAATATATATTATTGTATA	4440
4441	TAGTTATATCTTCAATTATGATTTATAAATATGTTTTTTTATTATGAACTCAATTTTAAGT	4500
4501	TTGATTTATGCGTTGGCGGGCTCGAGGAGGCACGGTGAACATTTTGGGTGCGGCTTAAC	4560
4561	GGGTGCGCCCGGCCCGGTTTCGGCCCATCCACGGCCCATCCCGTGTGCGGCTCGTTCGGTG	4620
4621	AGTTCAGCCCGCTCGGACAACCCGTCCCCGGCCCGGATAATTAAATCGGGCCTAACCGTGCC	4680
4681	GTGCTTAAACGGTCCGTGCCCTAACGGACCGGGCCGGGGCGGCCGTTTGACATCTCTA	4740
4741	GTGGTGTGATTAGAGATGGCGATGGGAACCGATCACTGATTCGGTGTGGAGAATTCGATA	4800
4801	TCAAGCTTATCGATACC	4817

OBR. 25A

211D	5N984											
60d					70d							
P	C	BR	ES	LP	MP	UP	C	BR	ES	LP	MP	UP



211D					5N984				
					39d		46d		
S	L	R	P	SH	LP	UP	LP	MP	UP

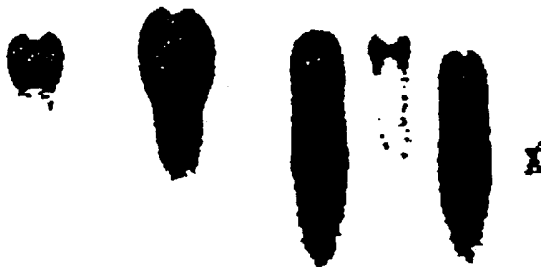


OBR. 25B

211D						5N984						
60d						70d						
P	C	BR	ES	LP	MP	UP	C	BR	ES	LP	MP	UP



211D					5N984				
					39d		46d		
S	L	R	P	SH	LP	UP	LP	MP	UP



OBR. 25C

211D						5N984					
60d						70d					
P	C	BR	ES	LP	MP UP	C	BR	ES	LP	MP	UP



211D					5N984				
					39d		46d		
S	L	R	P	SH	LP	UP	LP	MP	UP

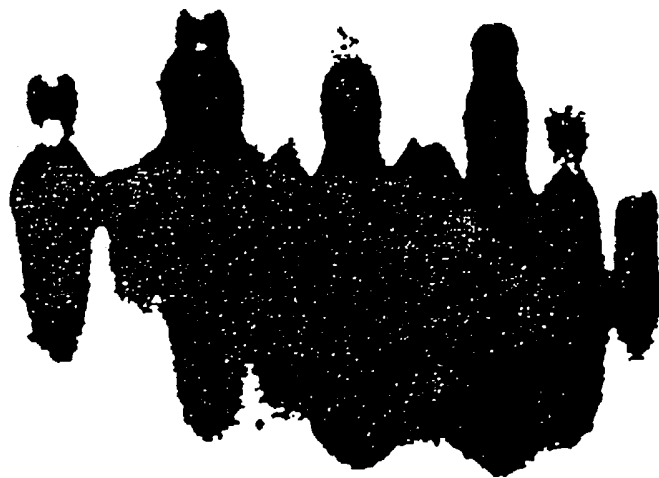


OBR. 25D

211D						5N984						
60d						70d						
P	C	BR	ES	LP	MP	UP	C	BR	ES	LP	MP	UP

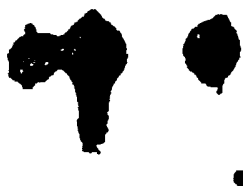


211D					5N984				
					39d		46d		
S	L	R	P	SH	LP	UP	LP	MP	UP

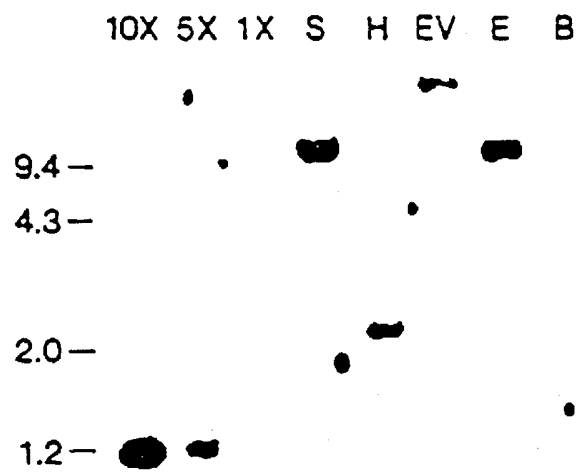


OBR. 26

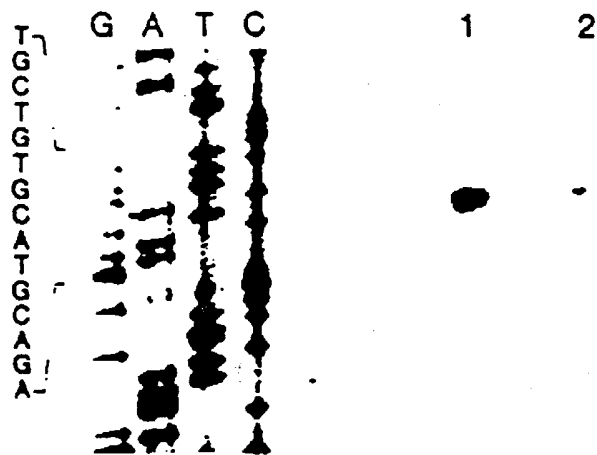
<u>211D</u>	<u>5N984</u>	<u>211D</u>
L P	L P	S1 S2 S3 S4 S5



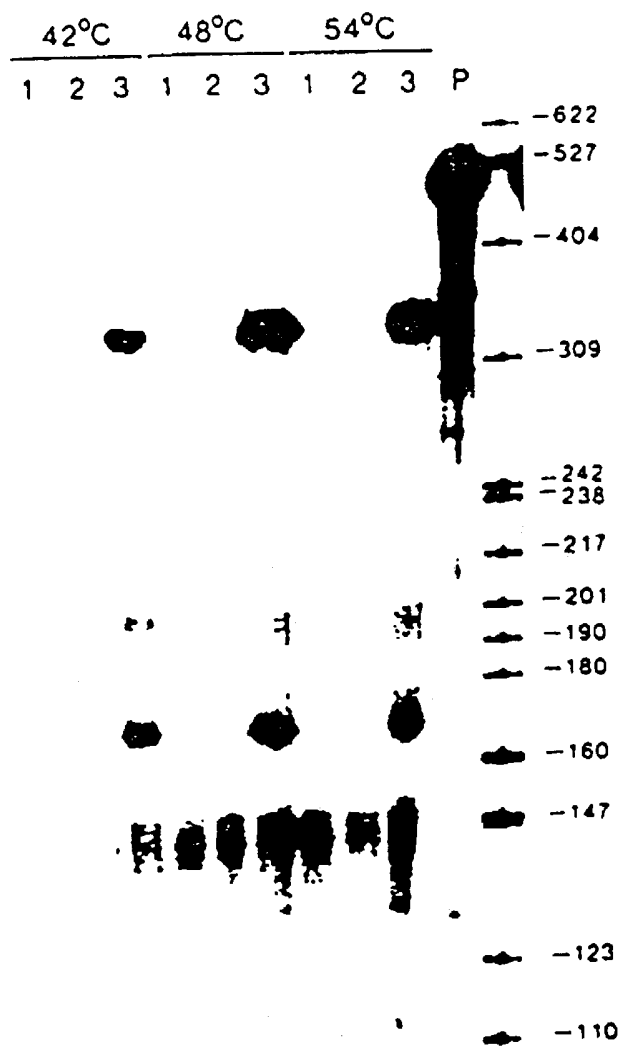
OBR. 27



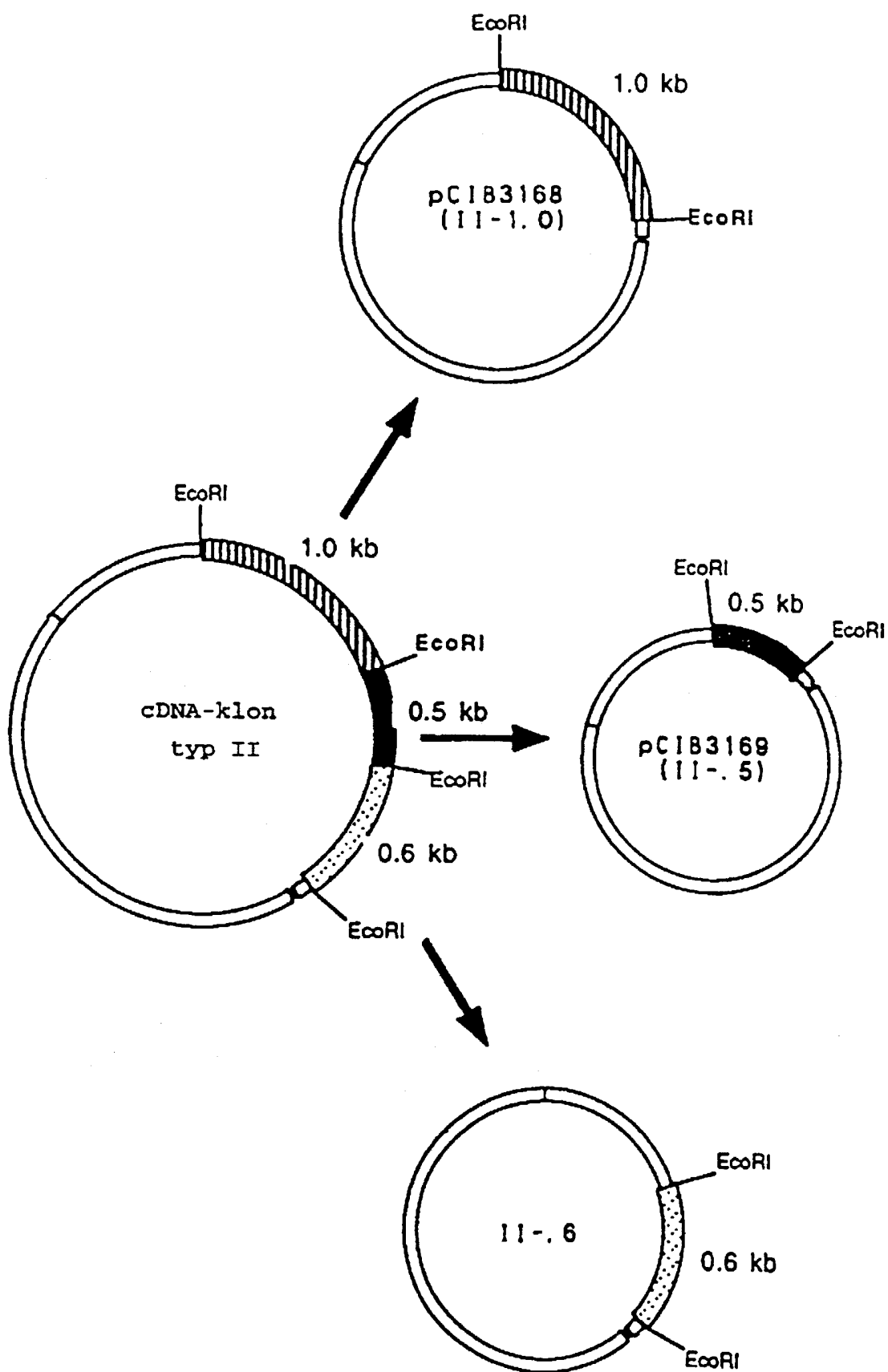
OBR. 28A



OBR. 28B



OBR. 29



OBR. 30

1 TG CAG ATC ATG CAC CAC CTC TCC GGC CAG CCC AAC GTG GTG GGC CTC CCG GGC GCG
 1>Gln Ile Met His His Leu Ser Gly Gln Pro Asn Val Val Gly Leu Arg Gly Ala
 57 TAC GAG GAC AAG CAG AGC GTG CAC CTC GTC ATG GAG CTG TGC GCG GGC GCG GAG CTC
 19>Tyr Glu Asp Lys Gln Ser Val His Leu Val Met Glu Leu Cys Ala Gly Gly Glu Leu

Aval

114 TTC GAC CCG ATC ATC CCC CGG GGC CAG TAC ACG GAG CCG GCG GCG GCG GAG CTG CTG
 38>Phe Asp Arg Ile Ile Ala Arg Gly Gln Tyr Thr Glu Arg Gly Ala Ala Glu Leu Leu
 171 CCG GCG ATC GTG CAG ATC GTG CAC ACC TGC CAC TCC ATG GCG GTG ATG CAC CCG GAC
 57>Arg Ala Ile Val Gln Ile Val His Thr Cys His Ser Met Gly Val Met His Arg Asp

Aval

228 ATC AAG CCC GAG AAC TTC CTG CTG CTC AGC AAG GAC GAG GAC GCG CCG CTC AAG GCG
 76>Ile Lys Pro Glu Asn Phe Leu Leu Leu Ser Lys Asp Glu Asp Ala Pro Leu Lys Ala
 285 ACC GAC TTC GCG CTC TCC GTC TTC TTC AAG GAG GCG GAG CTG CTC AGG GAC ATC GTC
 95>Thr Asp Phe Gly Leu Ser Val Phe Phe Lys Glu Gly Glu Leu Leu Arg Asp Ile Val

Aval

342 GGC AGC GCG TAC TAC ATC GCG CCC GAG GTG CTC AAG ACG AAG TAC GCG CCG GAG GCG
 114>Gly Ser Ala Tyr Tyr Ile Ala Pro Glu Val Leu Lys Arg Lys Tyr Gly Pro Glu Ala
 399 GAC ATC TGG AGC GTC GCG GTC ATG CTC TAC ATC TTC CTC GCG GCG GTG CCG CCC TTC
 133>Asp Ile Trp Ser Val Gly Val Met Leu Tyr Ile Phe Leu Ala Gly Val Pro Pro Phe
 456 TGG GCA GAG AAC GAG AAC GCG ATC TTC ACC GCG ATC CTG CGA GCG CAG CTC GAC CTC
 152>Trp Ala Glu Asn Glu Asn Gly Ile Phe Thr Ala Ile Leu Arg Gly Gln Leu Asp Leu
 513 TCC AGC GAG CCA TGG CCA CAC ATC TCG CCG GGA GCG AAG GAT CTC GTC AAG AAG ATG
 171>Ser Ser Glu Pro Trp Pro His Ile Ser Pro Gly Ala Lys Asp Leu Val Lys Lys Met
 570 CTC AAC ATC AAC CCC AAG GAG CCG CTC ACG CCG TTC CAG GTC CTC AAT CAC CCA TGG
 190>Leu Asn Ile Asn Pro Lys Glu Arg Leu Thr Ala Phe Gln Val Leu Asn His Pro Trp
 627 ATC AAA GAA GAC GGA GAC GCG CCT GAC ACG CCG CTT GAC AAC GTT GTT CTC GAC AGG
 209>Ile Lys Glu Asp Gly Asp Ala Pro Asp Thr Pro Leu Asp Asn Val Val Leu Asp Arg
 684 CTC AAG CAG TTC AGG GCG ATG AAC CAG TTC AAG AAA GCA GCA TTG AGG ATC ATA GCT
 228>Leu Lys Gln Phe Arg Ala Met Asn Gln Phe Lys Lys Ala Ala Leu Arg Ile Ile Ala
 741 GCG TGC CTA TCC GAA GAG GAG ATC ACA GCG CTG AAG GAG ATG TTC AAG AAC ATT GAC
 247>Gly Cys Leu Ser Glu Glu Glu Ile Thr Gly Leu Lys Glu Met Phe Lys Asn Ile Asp
 798 AAG GAT AAC AGC GCG ACC ATT ACC CTC GAC GAG CTC AAA CAC GCG TTG GCA AAG CAC
 266>Lys Asp Asn Ser Gly Thr Ile Thr Leu Asp Glu Leu Lys His Gly Leu Ala Lys His
 855 GCG CCC AAG CTG TCA GAC AGC GAA ATG GAG AAA CTA ATG GAA GCA GCT GAC GCT GAC
 285>Gly Pro Lys Leu Ser Asp Ser Glu Met Glu Lys Leu Met Glu Ala Ala Asp Ala Asp

EcoRI

912 GGC AAC GCG TTA ATT GAC TAC GAC GAA TTC GTC ACC GCA ACA GTG CAT ATG AAC AAA
 304>Gly Asn Gly Leu Ile Asp Tyr Asp Glu Phe Val Thr Ala Thr Val His Met Asn Lys

OBR. 30 - pokr.

969 CTG GAT AGA GAA GAG CAC CTT TAC ACA GCA TTC CAG TAT TTC GAC AAG GAC AAC AGC
 323 Leu Asp Arg Glu Glu His Leu Tyr Thr Ala Phe Gln Tyr Phe Asp Lys Asp Asn Ser
 1026 GCG TAC ATT ACT AAA GAA GAG CTT GAG CAC GCC TTG AAG GAG CAA GCG TTG TAT GAC
 342 Gly Tyr Ile Thr Lys Glu Glu Leu Glu His Ala Leu Lys Glu Gln Gly Leu Tyr Asp
 1083 GCC GAT AAA ATC AAA GAC ATC ATC TCC GAT GCC GAC TCT GAC AAT GAT GGA AGG ATA
 361 Ala Asp Lys Ile Lys Asp Ile Ile Ser Asp Ala Asp Ser Asp Asn Asp Gly Arg Ile
 1140 GAT TAT TCA GAG TTT GTG GCG ATG ATG AGG AAA GCG ACG GCT GGT GCC GAG CCA ATG
 380 Asp Tyr Ser Glu Phe Val Ala Met Met Arg Lys Gly Thr Ala Gly Ala Glu Pro Met
 1197 AAC ATC AAG AAG AGG CGA GAC ATA GTC CTA TAG TGAAGTGAAGCAGCAAGTGTGTAATGTAATGTG
 399 Asn Ile Lys Lys Arg Arg Asp Ile Val Leu ...
 1263 TATAGCGCTCAAACAGCAAAATTGTACATCTGTACACAAATGCAATGGGGTTACTTTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 ①
 1340 AAAAAAAAAA

OBR. 31

81

VLP

VL

ZL

A

P

V

Z

D

K



OBR. 32

doi CDPK ptn YSHGKELGRGQFGYTHLCTHRTSGEKLACKTIAKRKLAAREDDOYRREVOIMHHLSGQPNVYGLRGAYE 162
 Y : : ELG: G: F: V: : C: : TS: : A K I : KL: AR: : : RE: I: L : PN: V L: :
 rot pk2 ptn YQLFEELGKGAFSYVRRGVKKTSTGEYAAKIIINTKKLSARDH-GKLEREARICRLK-HPNIVRLHCSIS 81

doi CDPK ptn DKOSYHLVHMLCAGGELFDRIIARGQYTERGAAELLRAIVQIVHTCHSMGVHHRDIXPENFLLLSKDEDA 232
 : : : LV: L: : GGELF: I: AR: Y: E: A: : : : : V: H : : HRD: KPN: LL SK : : A
 rot pk2 ptn EEGFHYLVFDLVTGGELFEDIYAREYYSEADASHCIHQILESYNHIIHQDQIVHRODKPENLLLASKCKGA 15'

doi CDPK ptn PLKATDFGLSYFFKEGELLR-DIVGSAYYIAPEVLKRX-YGPEADIWSVGVMHYIFLAGYPPFWAENENG 300
 : : K: DFG: : : : : : : G: Y: : PEVL: : YG : DIW: GV: LY: L: G PPFW: E: :
 rot pk2 ptn AYKLAOFGLAIEVOGEQQAWFGFAGTGYLSPEVLRKDPYGPVDIWACGVILYILLVGYPFWOEDGKH 22'

doi CDPK ptn !FTAILRGOLDLSSEPWPPIHSPGAKDLVKKMLN:NPKEKLTAFQVLNHPWIKEDGDAPDTPLDNVYLDRL 370
 : : : I G: D: S W : : P AK: L: : ML INP R: TA Q L: HPW: : : : : : : L
 rot pk2 ptn LYQQIKAGAYDFPSPEWDTVTPEAKNLINQMLTINPAKRITADCALXHPVYCRSTVASHMHRGETVECL 29'

doi CDPK ptn <SFRANNGFKKAALRII 387
 : : F: A: : : K A L : :
 rot pk2 ptn RKFNARRK_KGAIL"MM 308

```

pol CDPX   pin  MM 530
              MM
humcoma pin   MM 146

```

OBR. 34

pol CDPK ptn VLGPRMEDVRATYSMGKELGRGQFGVTHLCTHRTSGEKLACKTIAKRKLAAREDDVQVVRREYQIMHHLSC 50
 soybean CDPK ptn VLPQRTQNIREVVEVGRKLGOGQFGTTFECTRRASGGKFACKSIPKRKLLCKEDYEDVWRETCIMHHLSE 9

pol CDPK ptn QPNVVGRLGAYEDKQSYHLYMELCAGGELFORIIARGQYTERGAAELLRAIVQIVHTCHSHGYPHROIKP 220
 soybean CDPK ptn HANVYRIEGTYEDSTAVHLYMELCEGGELFORIVQKHYSERQAARLIKTIYEVVEACHSLGYMHRDLKP 61

pol CDPK ptn ENFLLSKDEDAPLKATDFGLSVFFKEGELLRDIVGSAYYIAPEVLKRYGPEADIVSYGVMLYIFLAGY 290
 soybean CDPK ptn ENLFDITIDEDAKLKATDFGLSVFYKPGESFCOVVGSPIYYVAPEVLRKLYGPESDVWSAGVILYILLSGV 23

pol CDPK ptn PPFWAENENGIFTAILRGQDLDSSEPWPPIISPGAKDLVKKHLNINPKERLTAFQVLNHPWIKEDGAPDT 350
 soybean CDPK ptn PPFVAESEPGLFRQILLGLDFHSEPWPISDSAKDLIRKMLDONPKTRLTAEVLRHPWIVDNIAPDK 33

pol CDPK ptn PLDNVYLDRLKQFRAMNQFKKAALRIIAGCLSEEEITGLKEMFKNIDKONSGTITLDELKHGLAKHGPKL 430
 soybean CDPK ptn PLDSAVLSRLKQFSAMNKLKKAALRVIAERLSEEEIGGLKELFKMIDONSGTITFDELKQGLKFGVSEL 37

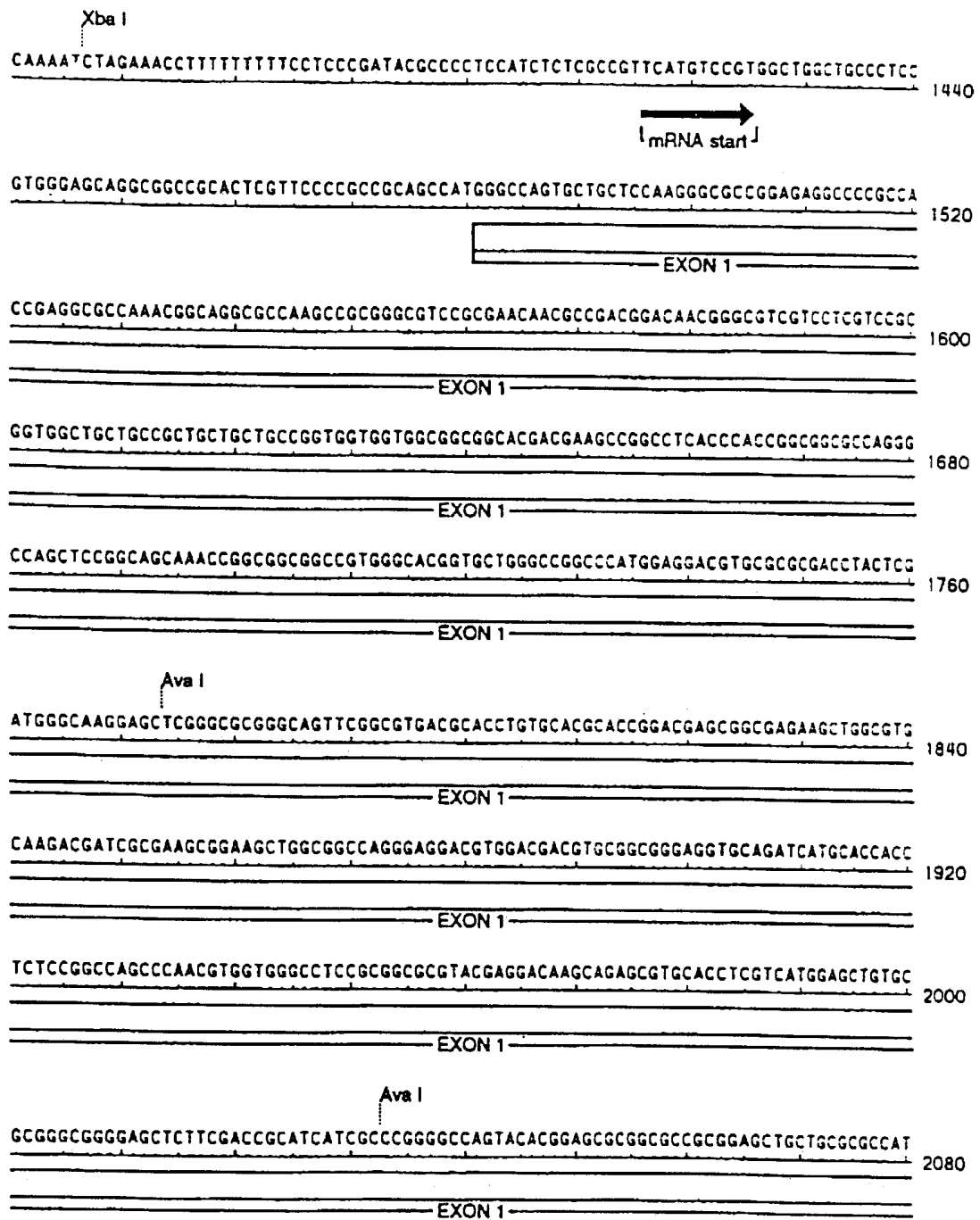
pol CDPK ptn SDSEMEKLMEEAADAOGNGLIDYDEFVTATVMMNKLDREEHLYTAFQYFDKONSGYITKEELEHAKKEOGL 500
 soybean CDPK ptn HESEIKOLMDAADIDKSGTIDYGEFIAATVHLNKLEREENLVSAFSPYFDKOGSGYITLOEIQCAKDFGL 44

pol CDPK ptn YDAOKIKDIISDADSONOGRIDYSEFVAMMRKGTAGAEPHNKK 544
 soybean CDPK ptn -DDI-IDDYKEISDADSGGIDYGEFAAMRKONGSIGRRTRK 484

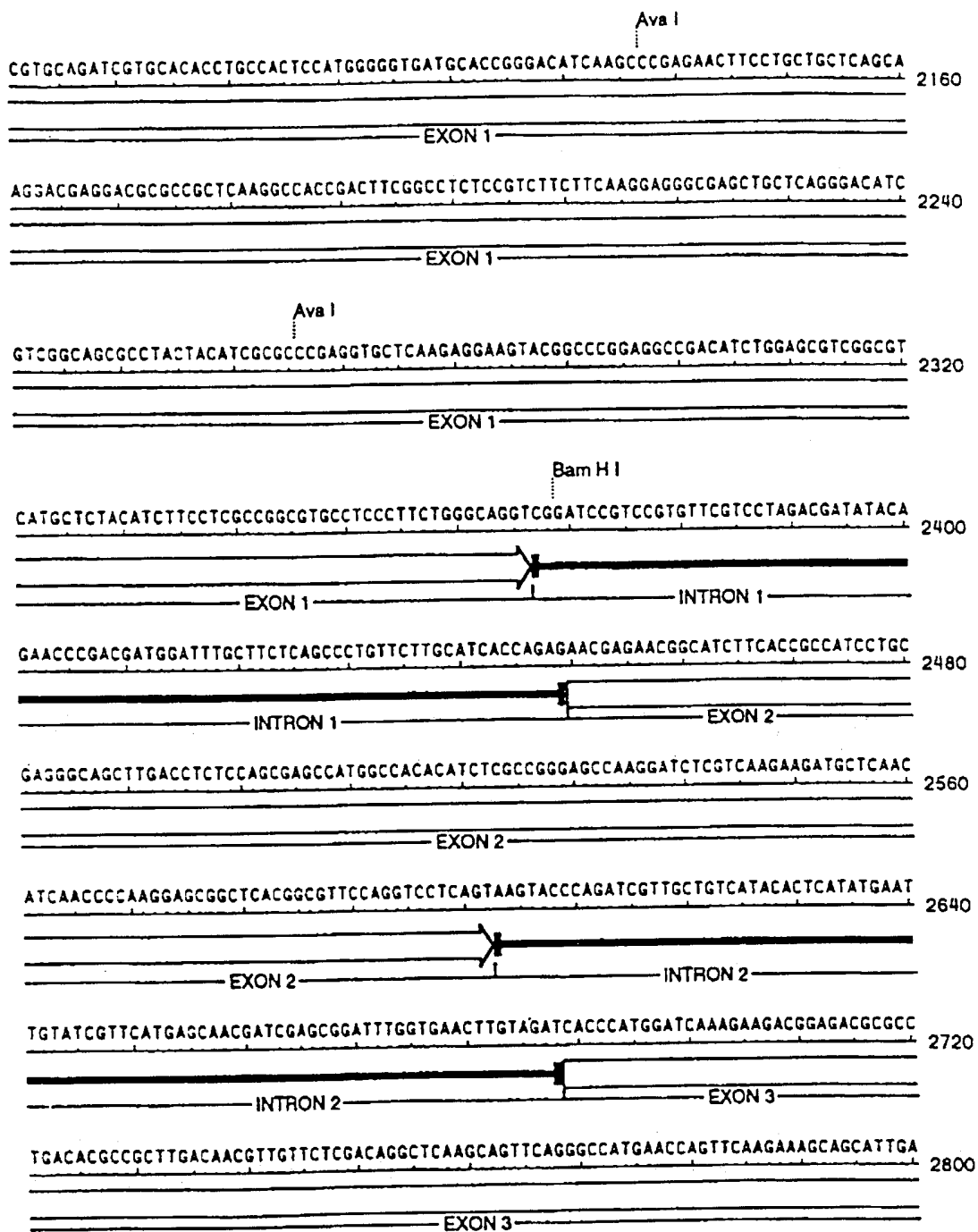
OBR. 35

TTAGTACACCTCTCCAATCGCTTGGGTGGCACATTCTTAGCTTTATCACATTTTAAGAAATAGAGTTCACCACCTTC 80
AAAATATGCCTATACAATGAATGATGCTTGGATGCAATATAGCTAGATTCAACTAGCTATATATGGTCAATAGAACCTG 160
TGAGCACCTCACAACACGACTTCAATTTTGAGACCCTAAGCGAGTAAATGGTTAAAGTCTCTTATTATTAGTCTTAGG 240
ACTTCTCCTTGCTAAATGCTTGTGACGATCTATATATCTTCCCCACTGCGGGAGATACTATATATAGGGCCTTGGACCT 320
CTAGGGTATCTCAAAGGCTAGTCACAACAATTCTCAACAGTATTTAATTTTATACATGTATGAACAGTGTAGGAATTTG 400
AGTGCCCAACCAAGAGTGGGAGGTGTAATTTGGGTAGCTAAACTTAAATAGGGCTCTTCTTATTAGGTTTATCTAGTC 480
TCTACTTAGACTAATTCAGAAAGAATTTTACAACCTATGGTTAATCATATCTCTAGTCTAAGCAAATTTAGGAAAGTTAA 560
AAGCACACAATTAGGCACATGTGAAAGATGTGTATGGTAAGTAAAAGACTTATAAGGAAAAAGTGGGTGAATCCTCAAGA 640
TGTGGTGGTATATCCCAATGATATTAGATGCCAGAATATAGGGGGGAAATCGATGTATACCATCTCTACCAGGATACCTG 720
TGCGGACTGTGCAACTGACACATGGACCATGGTGTCTTCTTAGATTGGTTATTAGCTAATTGCGCTACAACCTTGTTCAA 800
GGCTAGACCAAATTAATAAATAATATTAACATAAAAAGTTAGGCAAACTATAGTAAATTATGCAGCGATCCAACAACA 880
AGCCATGTCTCGTGGGTCATGAGCCACGCGTCGGCCATACCCACATGATGTTTCCATACGGATGGTCTTATGCAATT 960
TTGTCTGCAAAACACAAGCCTTAATACAGCCACGCGACAATCATGGAAGTGGTCGTTTTAGGTCTCATCATGAAGTTCA 1040
GGGAAAACGCATCAAATGTAATGCAGAGAAATGGTATTTCTTCTTTGTAATCAGGGAGAGGAGTACCATCAGTACAGA 1120
EcoRI
TTCAGAATCAGAATTCAGTCTTCCAACGACAATAATCGCAGCATCTTGTAATAATTTGCAGAACTTCTGTTTGACTTGT 1200
AGCCCTGACCTTTGCAAATATTTGAAGTTGTGCCTGCTGACACAACCTCAATCTGGAAGTGTGTTGATCAGTTTTGCCA 1280
GAAACAGCAAGCAGCCTATATATATCTGTACAGAGACACCTGCGGCCCTCTTCTTTCCGGCCATTCCCTCCCTACCTT 1360

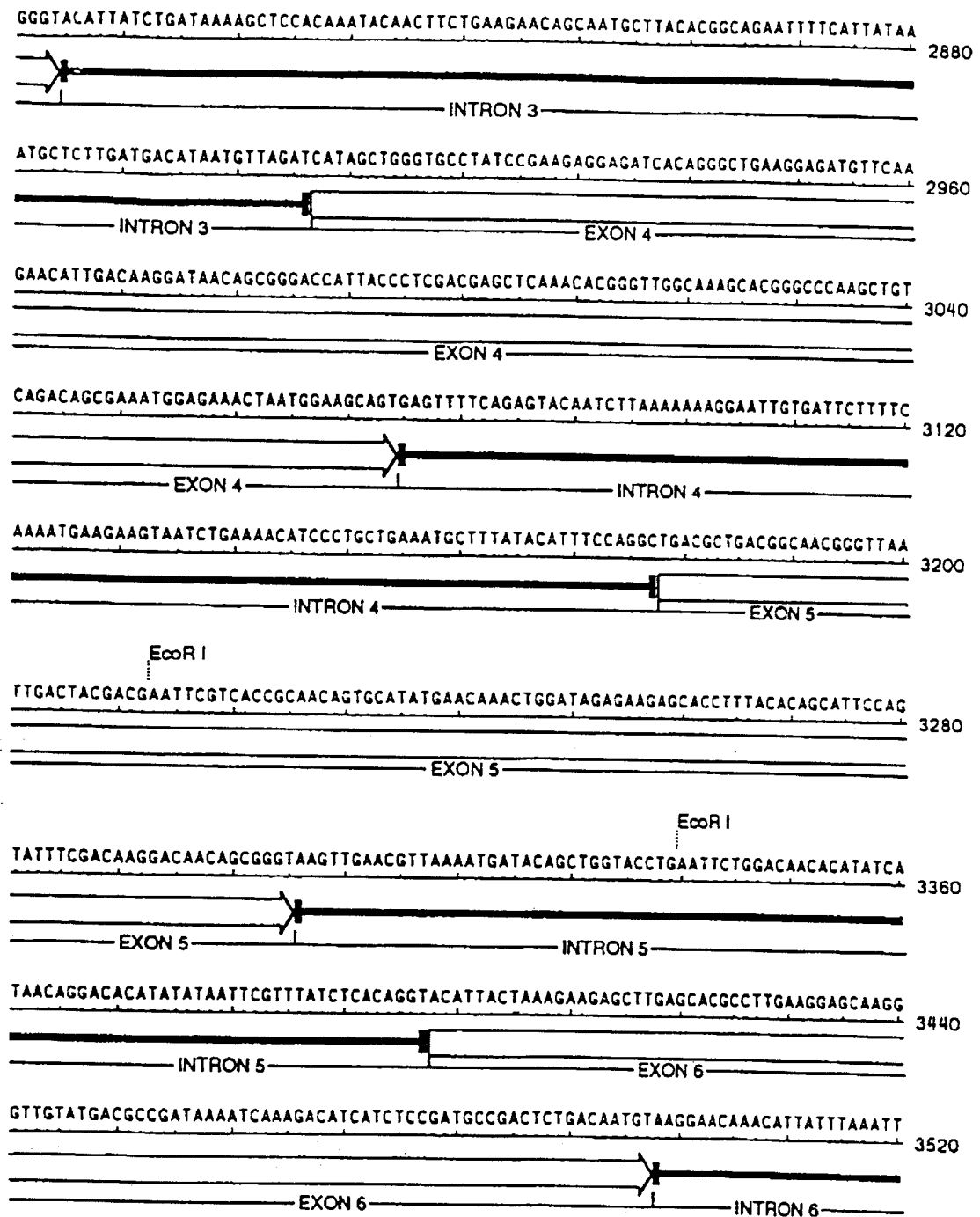
OBR. 35 - pokr. 1



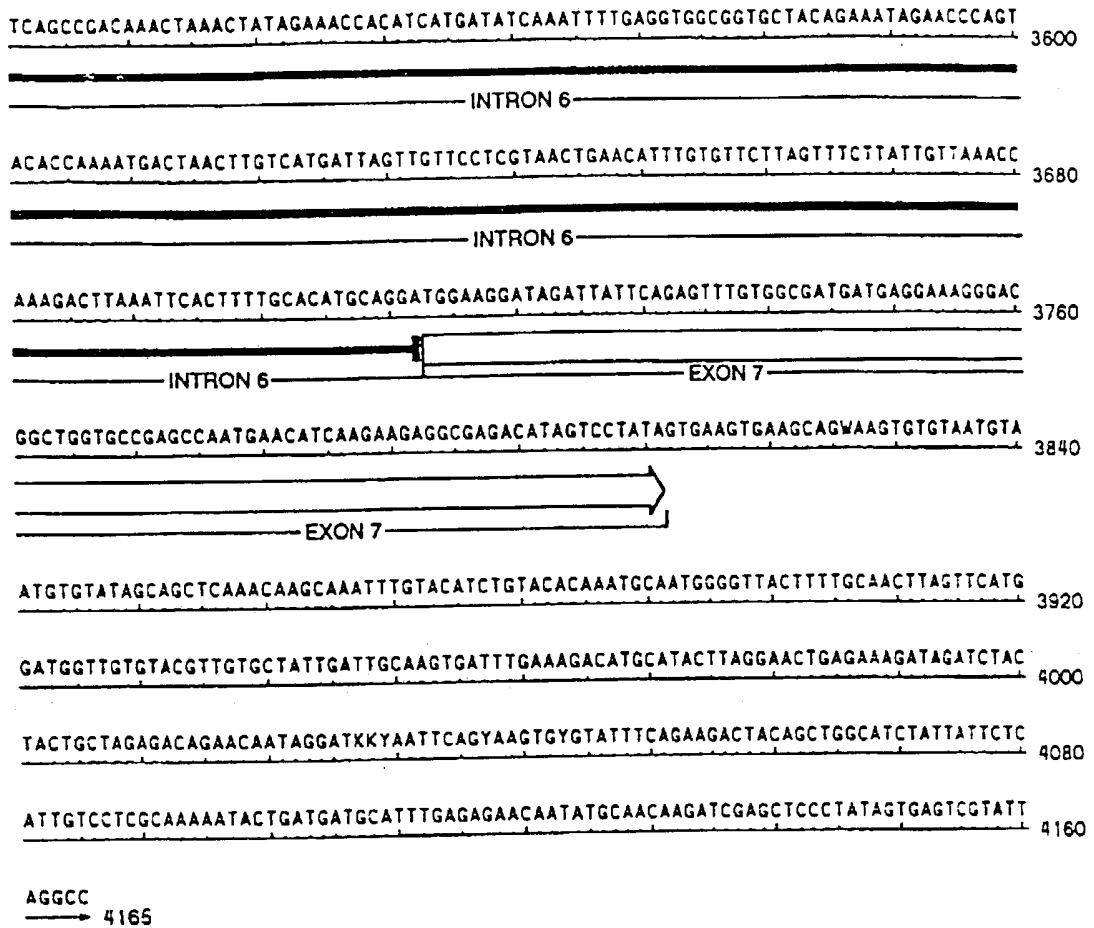
OBR. 35 - pokr. 2



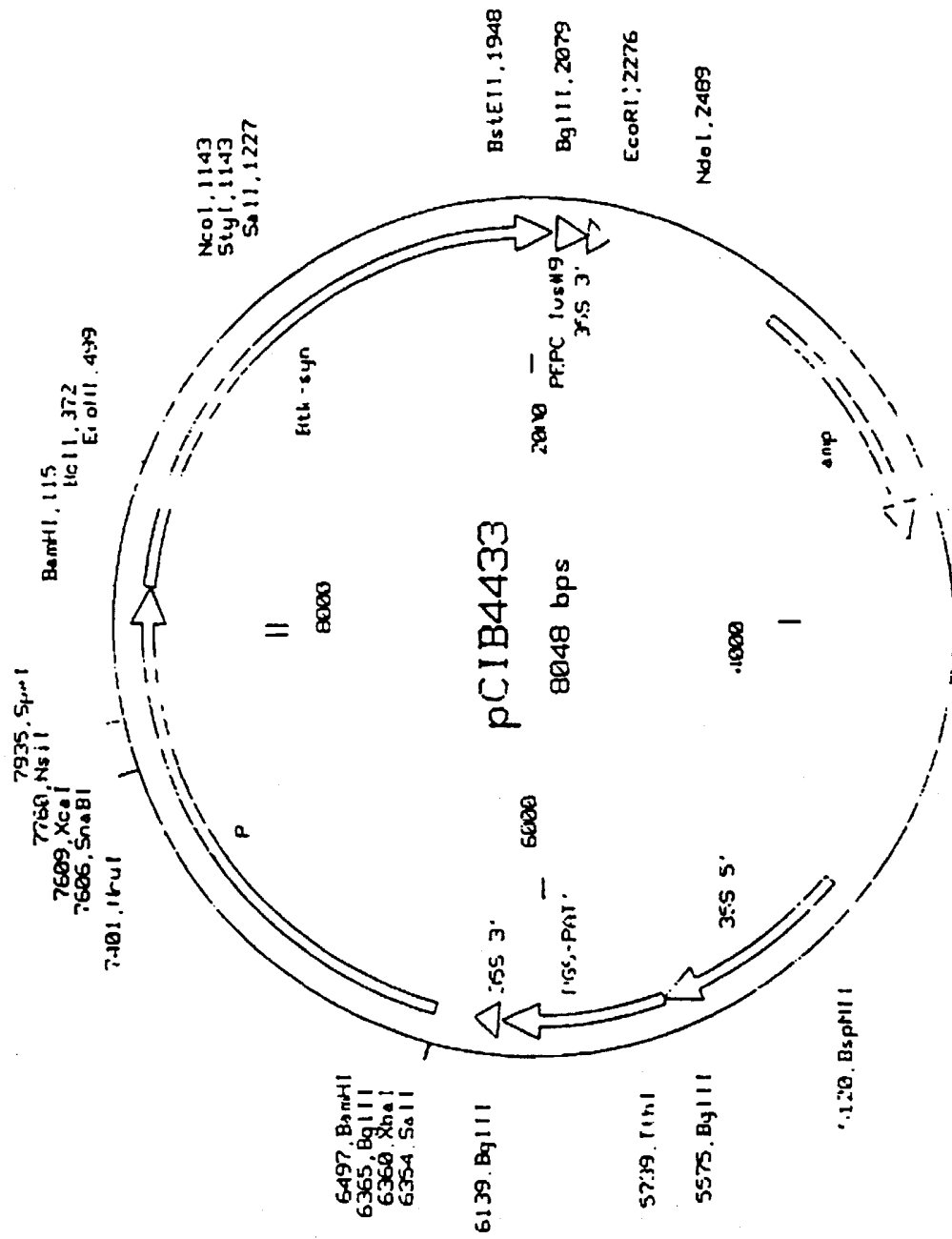
OBR. 35 - pokr. 3



OBR. 35 - pokr. 4



OBR. 36



OBR. 37

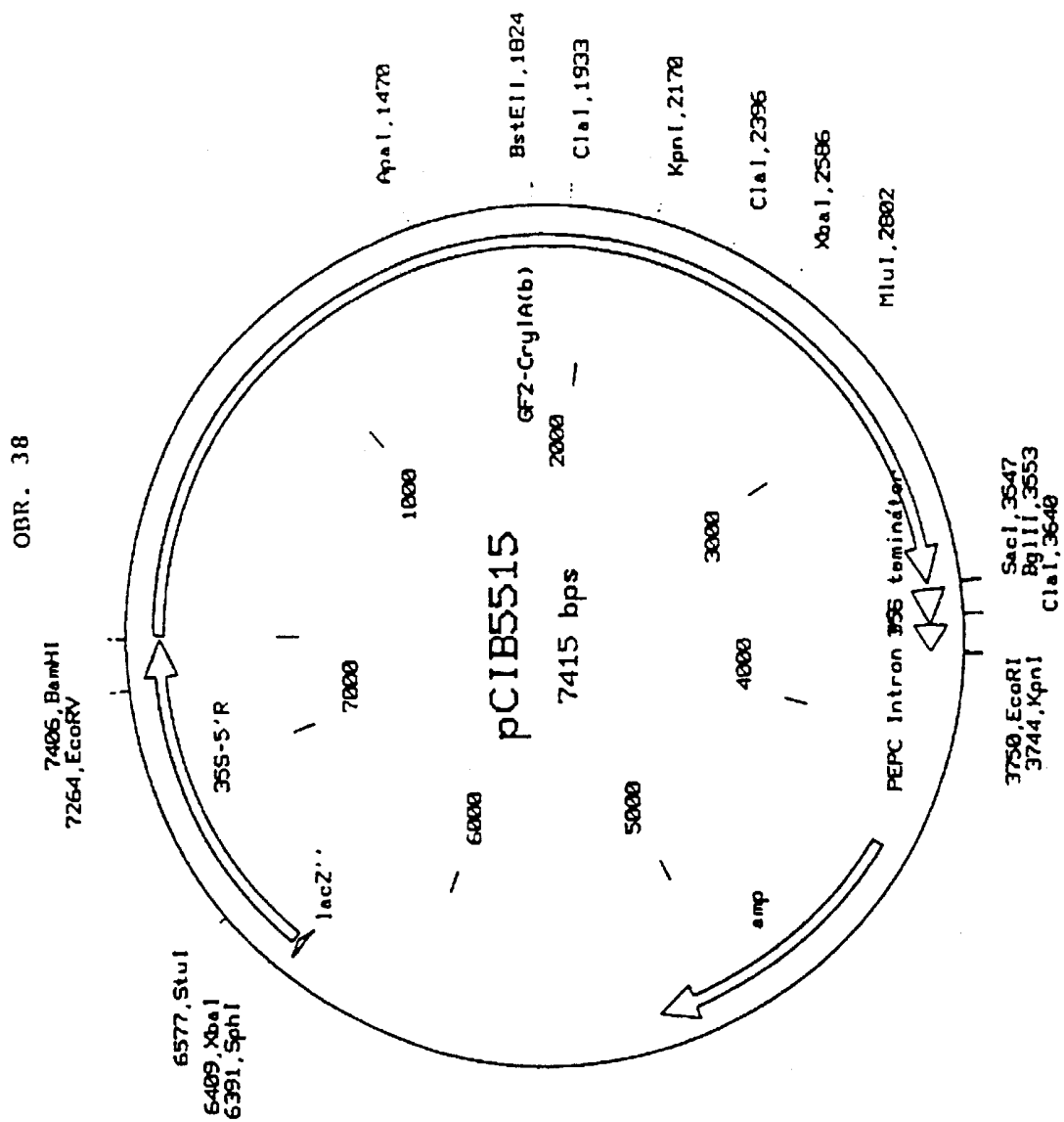
1 ATGGACAACA ACCCCAACAT CAACGAGTGC ATCCCCTACA ACTGCCTGAG CAACCCCGAG
 MetAspAsn AsnProAsn IleAsnGluCys IleProTyr AsnCysLeu SerAsnProGlu
 61 GTGGAGGTGC TGGGCGGCGA GCGCATCGAG ACCGGCTACA CCCCATCGA CATCAGCCTG
 ValGluVal LeuGlyGly GluArgIleGlu ThrGlyTyr ThrProIle AspIleSerLeu
 121 AGCCTGACCC AGTTCCTGCT GAGCGAGTTC GTGCCCCGGC CCGGCTTCGT GCTGGGCCTG
 SerLeuThr GlnPheLeu LeuSerGluPhe ValProGly AlaGlyPhe ValLeuGlyLeu
 181 GTGGACATCA TCTGGGGCAT CTTCGGCCCC AGCCAGTGGG ACGCCTTCCT GGTGCAGATC
 ValAspIle IleTrpGly IlePheGlyPro SerGlnTrp AspAlaPhe LeuValGlnIle
 241 GAGCAGCTGA TCAACCAGCG CATCGAGGAG TTCGCCCCGA ACCAGGCCAT CAGCCGCCTG
 GluGlnLeu IleAsnGln ArgIleGluGlu PheAlaArg AsnGlnAla IleSerArgLeu
 301 GAGGGCCTGA GCAACCTGTA CCAAATCTAC GCCGAGAGCT TCCGCGAGTG GGAGGCCGAC
 GluGlyLeu SerAsnLeu TyrGlnIleTyr AlaGluSer PheArgGlu TrpGluAlaAsp
 361 CCCACCAACC CCGCCCTGCG CGAGGAGATG CGCATCCAGT TCAACGACAT GAACAGCGCC
 ProThrAsn ProAlaLeu ArgGluGluMet ArgIleGln PheAsnAsp MetAsnSerAla
 421 CTGACCACCG CCATCCCCCT GTTCGCCGTG CAGAACTACC AGGTGCCCCCT GCTGAGCGTG
 LeuThrThr AlaIlePro LeuPheAlaVal GlnAsnTyr GlnValPro LeuLeuSerVal
 481 TACGTGCAGG CCGCCAACCT GCACCTGAGC GTGCTGCGCG ACGTCAGCGT GTTCGGCCAG
 TyrValGln AlaAlaAsn LeuHisLeuSer ValLeuArg AspValSer ValPheGlyGln
 541 CGCTGGGGCT TCGACGCCGC CACCATCAAC AGCCGCTACA ACGACCTGAC CCGCCTGATC
 ArgTrpGly PheAspAla AlaThrIleAsn SerArgTyr AsnAspLeu ThrArgLeuIle
 601 GGCAACTACA CCGACCACGC CGTGGCTGG TACAACACCG GCCTGGAGCG CGTGTGGGGT
 GlyAsnTyr ThrAspHis AlaValArgTrp TyrAsnThr GlyLeuGlu ArgValTrpGly
 661 CCCGACAGCC GCGACTGGAT CAGGTACAAC CAGTTCGCC CCGAGCTGAC CCGACCGTG
 ProAspSer ArgAspTrp IleArgTyrAsn GlnPheArg ArgGluLeu ThrLeuThrVal
 721 CTGGACATCG TGAGCCTGTT CCCCACCTAC GACAGCCGCA CCTACCCCAT CCGCACCGTG
 LeuAspIle ValSerLeu PheProAsnTyr AspSerArg ThrTyrPro IleArgThrVal
 781 AGCCAGCTGA CCCGCGAGAT TTACACCAAC CCCGTGCTGG AGAACTTCGA CGGCAGCTTC
 SerGlnLeu ThrArgGlu IleTyrThrAsn ProValLeu GluAsnPhe AspGlySerPhe
 841 CGCGGCAGCG CCCAGGGCAT CGAGGGCAGC ATCCGCAGCC CCCACCTGAT GGACATCCTG
 ArgGlySer AlaGlnGly IleGluGlySer IleArgSer ProHisLeu MetAspIleLeu
 901 AACAGCATCA CCATCTACAC CGACGCCCAC CGCGGCGAGT ACTACTGGAG CGGCCACCAG
 AsnSerIle ThrIleTyr ThrAspAlaHis ArgGlyGlu TyrTyrTrp SerGlyHisGln
 961 ATCATGGCCA GCCCCGTGG CTTCAGCGGC CCCGAGTTCA CCTTCCCCCT GTACGGCACC
 IleMetAla SerProVal GlyPheSerGly ProGluPhe ThrPhePro LeuTyrGlyThr
 1021 ATGGGCAACG CTGCACCTCA GCAGCGCATC GTGGCACAGC TGGGCCAGGG AGTGTAACGC
 MetGlyAsn AlaAlaPro GlnGlnArgIle ValAlaGln LeuGlyGln GlyValTyrArg
 1081 ACCCTGAGCA GCACCCTGTA CCGTCGACCT TTCAACATCG GCATCAACAA CCAGCAGCTG
 ThrLeuSer SerThrLeu TyrArgArgPro PheAsnIle GlyIleAsn AsnGlnGlnLeu
 1141 AGCGTGCTGG ACGGCACCGA GTTCGCCTAC GGCACCAGCA GCAACCTGCC CAGCGCCGTG
 SerValLeu AspGlyThr GluPheAlaTyr GlyThrSer SerAsnLeu ProSerAlaVal
 1201 TACCGCAAGA GCGGCACCGT GGACAGCCTG GACGAGATCC CCCCTCAGAA CAACAACGTG
 TyrArgLys SerGlyThr ValAspSerLeu AspGluIle ProProGln AsnAsnAsnVal

OBR. 37 - pokr. 1

1261 CCACCTCGAC AGGGCTTCAG CCACCGTCTG AGCCACGTGA GCATGTTCCG CAGTGGCTTC
 ProProArg GlnGlyPhe SerHisArgLeu SerHisVal SerMetPhe ArgSerGlyPhe
 1321 AGCAACAGCA GCGTGAGCAT CATCCGTGCA CCTATGTTCA GCTGGATTCA CCGCAGTGCC
 SerAsnSer SerValSer IleIleArgAla ProMetPhe SerTrpIle HisArgSerAla
 1381 GAGTTCAACA ACATCATCCC CAGCAGCCAG ATCACCCAGA TCCCCCTGAC CAAGAGCACC
 GluPheAsn AsnIleIle ProSerSerGln IleThrGln IleProLeu ThrLysSerThr
 1441 AACCTGGGCA GCGGCACCAG CGTGGTGAAG GGCCCCGGCT TCACCGGGG CGACATCCTG
 AsnLeuGly SerGlyThr SerValValLys GlyProGly PheThrGly GlyAspIleLeu
 1501 CGCCGCACCA GCCCCGGCCA GATCAGCACC CTGCGCGTGA ACATCACCGC CCCCCTGAGC
 ArgArgThr SerProGly GlnIleSerThr LeuArgVal AsnIleThr AlaProLeuSer
 1561 CAGCGCTACC GCGTCCGCAT CCGCTACGCC AGCACCACCA ACCTGCAGTT CCACACCAGC
 GlnArgTyr ArgValArg IleArgTyrAla SerThrThr AsnLeuGln PheHisThrSer
 1621 ATCGACGGCC GCCCCATCAA CCAGGGCAAC TTCAGCGCCA CCATGAGCAG CGGCAGCAAC
 IleAspGly ArgProIle AsnGlnGlyAsn PheSerAla ThrMetSer SerGlySerAsn
 1681 CTGCAGAGCG GCAGCTTCCG CACCGTGGGC TTCACCACCC CCTTCAACTT CAGCAACGGC
 LeuGlnSer GlySerPhe ArgThrValGly PheThrThr ProPheAsn PheSerAsnGly
 1741 AGCAGCGTGT TCACCCCTGAG CGCCCACGTG TTCAACAGCG GCAACGAGGT GTACATCGAC
 SerSerVal PheThrLeu SerAlaHisVal PheAsnSer GlyAsnGlu ValTyrIleAsp
 1801 CGCATCGAGT TCGTGCCCGC CGAGGTGACC TTCGAGGCGG AGTACGACCT GGAGAGGGCT
 ArgIleGlu PheValPro AlaGluValThr PheGluAla GluTyrAsp LeuGluArgAla
 1861 CAGAAGGCCG TGAACGAGCT GTTCACCAGC AGCAACCAGA TCGGCCTGAA GACCGACGTG
 GlnLysAla ValAsnGlu LeuPheThrSer SerAsnGln IleGlyLeu LysThrAspVal
 1921 ACCGACTACC ACATCGATCA AGTATCCAAT TTAGTTGAGT GTTTATCTGA TGAATTTTGT
 ThrAspTyr HisIleAsp GlnValSerAsn LeuValGlu CysLeuSer AspGluPheCys
 1981 CTGGATGAAA AAAAAGAATT GTCCGAGAAA GTCAAACATG CGAAGCGACT TAGTGATGAG
 LeuAspGlu LysLysGlu LeuSerGluLys ValLysHis AlaLysArg LeuSerAspGlu
 2041 CGGAATTTAC TTCAAGATCC AAACTTTGA GGGATCAATA GACAACTAGA CCGTGGCTGG
 ArgAsnLeu LeuGlnAsp ProAsnPheArg GlyIleAsn ArgGlnLeu AspArgGlyTrp
 2101 AGAGGAAGTA CGGATATTAC CATCCAAGGA GGCGATGACG TATTCAAAGA GAATTACGTT
 ArgGlySer ThrAspIle ThrIleGlnGly GlyAspAsp ValPheLys GluAsnTyrVal
 2161 ACGCTATTGG GTACCTTTGA TGAGTGCTAT CCAACGTATT TATATCAAAA AATAGATGAG
 ThrLeuLeu GlyThrPhe AspGluCysTyr ProThrTyr LeuTyrGln LysIleAspGlu
 2221 TCGAAATTAA AAGCCTATAC CCGTTACCAA TTAAGAGGGT ATATCGAAGA TAGTCAAGAC
 SerLysLeu LysAlaTyr ThrArgTyrGln LeuArgGly TyrIleGlu AspSerGlnAsp
 2281 TTAGAAATCT ATTTAATTCG CTACATGCC AAACACGAAA CAGTAAATGT GCCAGGTACG
 LeuGluIle TyrLeuIle ArgTyrAsnAla LysHisGlu ThrValAsn ValProGlyThr
 2341 GGTTCCTTAT GGCCGCTTTC AGCCCCAAGT CCAATCGGAA AATGTGGGGA GCCGAATCGA
 GlySerLeu TrpProLeu SerAlaProSer ProIleGly LysCysGly GluProAsnArg
 2401 TGCGCTCCGC ACCTGGAGTG GAACCCGGAC CTAGACTGCA GCTGCAGGGA CGGGGAGAAG
 CysAlaPro HisLeuGlu TrpAsnProAsp LeuAspCys SerCysArg AspGlyGluLys
 2461 TGCGCCCATC ATTCCCATCA TTTCTCCTTG GACATTGATG TTGGATGTAC AGACTTAAAT
 CysAlaHis HisSerHis HisPheSerLeu AspIleAsp ValGlyCys ThrAspLeuAsn
 2521 GAGGACTTAG GTGTATGGGT GATATTCAAG ATTAAGACGC AAGATGGCCA TGCAAGACTA
 GluAspLeu GlyValTrp ValIlePheLys IleLysThr GlnAspGly HisAlaArgLeu
 2581 GGAAATCTAG AATTCTCGA AGAGAAACCA TTAGTAGGAG AAGCACTAGC TCGTGTGAAA
 GlyAsnLeu GluPheLeu GluGluLysPro LeuValGly GluAlaLeu AlaArgValLys

OBR. 37 - pokr. 2

2641 AGAGCGGAGA AAAAATGGAG AGACAAACGT GAAAAATTGG AATGGGAAAC AAATATTGTT
 ArgAlaGlu LysLysTrp ArgAspLysArg GluLysLeu GluTrpGlu ThrAsnIleVal
 2701 TATAAAGAGG CAAAAGAATC TG TAGATGCT TTATTTGTAA ACTCTCAATA TGATAGATTA
 TyrLysGlu AlaLysGlu SerValAspAla LeuPheVal AsnSerGln TyrAspArgLeu
 2761 CAAGCGGATA CCAACATCGC GATGATTCAT GCGGCAGATA AACCGGTTCA TAGCATTCTGA
 GlnAlaAsp ThrAsnIle AlaMetIleHis AlaAlaAsp LysArgVal HisSerIleArg
 2821 GAAGCTTATC TGCCTGAGCT GTCTGTGATT CCGGGTGTCA ATGCGGCTAT TTTTGAAGAA
 GluAlaTyr LeuProGlu LeuSerValIle ProGlyVal AsnAlaAla IlePheGluGlu
 2881 TTAGAAGGGC GTATTTTCAC TGCATTCTCC CTATATGATG CGAGAAATGT CATTAAAAAT
 LeuGluGly ArgIlePhe ThrAlaPheSer LeuTyrAsp AlaArgAsn ValIleLysAsn
 2941 GGTGATTTTA ATAATGGCTT ATCCTGCTGG AACGTGAAAG GGCATGTAGA TGTAGAAGAA
 GlyAspPhe AsnAsnGly LeuSerCysTrp AsnValLys GlyHisVal AspValGluGlu
 3001 CAAAACAACC ACCGTTCCGT CCTTGTGTGT CCGGAATGGG AAGCAGAAGT GTCACAAGAA
 GlnAsnAsn HisArgSer ValLeuValVal ProGluTrp GluAlaGlu ValSerGlnGlu
 3061 GTTCGTGTCT GTCCGGGTCTG TGGCTATATC CTCGTGTCA CAGCGTACAA GGAGGGATAT
 ValArgVal CysProGly ArgGlyTyrIle LeuArgVal ThrAlaTyr LysGluGlyTyr
 3121 GGAGAAGGTT GCGTAACCAT TCATGAGATC GAGAACAATA CAGACGAAGT GAAGTTTAGC
 GlyGluGly CysValThr IleHisGluIle GluAsnAsn ThrAspGlu LeuLysPheSer
 3181 AACTGTGTAG AAGAGGAAGT ATATCCAAAC AACACGGTAA CGTGTAATGA TTATACTGCG
 AsnCysVal GluGluGlu ValTyrProAsn AsnThrVal ThrCysAsn AspTyrThrAla
 3241 ACTCAAGAAG AATATGAGGG TACGTACACT TCTCGTAATC GAGGATATGA CGGAGCCTAT
 ThrGlnGlu GluTyrGlu GlyThrTyrThr SerArgAsn ArgGlyTyr AspGlyAlaTyr
 3301 GAAAGCAATT CTTCTGTACC AGCTGATTAT GCATCAGCCT ATGAAGAAAA AGCATATACA
 GluSerAsn SerSerVal ProAlaAspTyr AlaSerAla TyrGluGlu LysAlaTyrThr
 3361 GATGGACGAA GAGACAATCC TTGTGAATCT AACAGAGGAT ATGGGGATTA CACACCACTA
 AspGlyArg ArgAspAsn ProCysGluSer AsnArgGly TyrGlyAsp TyrThrProLeu
 3421 CCAGCTGGCT ATGTGACAAA AGAATTAGAG TACTTCCCAG AAACCGATAA GGTATGGATT
 ProAlaGly TyrValThr LysGluLeuGlu TyrPhePro GluThrAsp LysValTrpIle
 3481 GAGATCGGAG AAACGGAAGG AACATTCATC GTGGACAGCG TGGGAATTACT TCTTATGGAG
 GluIleGly GluThrGlu GlyThrPheIle ValAspSer ValGluLeu LeuLeuMetGlu
 3541 GAATAA
 Glu---



Konec dokumentu