

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.01.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/9801408**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.12.2000**
(Věstník č. 12/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/08553**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/37782**

(21) Číslo dokumentu:

2000 -2696

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 15/29
C 12 N 15/82
C 07 K 14/415
A 23 L 3/375
A 23 G 9/02
A 23 G 9/04
A 01 H 5/00

(71) Přihlašovatel:
UNILEVER N. V., Rotterdam, NL;

(72) Původce:
Jarman Carl Dudley, Sharnbrook, GB;
Sidebottom Christopher Michael, Sharnbrook, GB;
Twigg Sarah, Sharnbrook, GB;
Worrall Dawn, Heslington, GB;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Protimrazový protein

(57) Anotace:
Popisuje protimrazový protein obsahující alespoň 40 % aminokyselin S, T nebo N a vykazující alespoň 80 % překryv s následující aminokyselinovou sekvencí D-E-Q-P-N-T-I-S-G-S-N-N-T-V-R-S-G-S-K-N-V-L-A-G-N-D-N-T-V-I-S-G-D-N-N-S-V-S-G-S-N-N-T-V-V-S-G-N-D-N-T-V-T-G-S-N-H-V-V-S-G-T-N-H-I-V-T-D-N-N-N-N-V-S-G-N-D-N-N-V-S-G-S-F-H-T-V-S-G-G-H-N-T-V-S-G-S-N-N-T-V-S-G-S-N-H-V-V-S-G-S-N-K-V-V-T-D-A a jeho upravené verze, které nemají ovlivnění inhibičné vlastností pro rekrystalizace ledu.

CZ 2000 - 2696 A3

22.09.00

Protimrazový protein

PV 2011-2696

~~64270~~Oblast techniky

Vynález popisuje protimrazové proteiny (AFP) a zmrazené potravinářské produkty, které obsahují AFP.

Dosavadní stav techniky

Protimrazové proteiny (AFP) se používají za účelem zlepšení tolerance potravin vůči mražení.

Použití AFP pro tyto účely je velmi dobře známé v oboru, zvláště vhodné jsou ty proteiny, které vykazují aktivitu inhibovat růst ledových krystalů (popisuje se například v dokumentu US 5,118,792).

V dokumentu WO 90/13571 se popisují protimrazové peptidy produkované chemicky nebo metodami rekombinace DNA. AFP jsou vhodné pro použití u potravinářských produktů. V příkladu 3B se popisuje způsob úpravy tvaru ledových krystalů, jestliže směs voda-led je mražená ve filmu v kombinaci s 0,01 % (hmot.) AFP.

Dokument WO 92/22581 popisuje rostlinné AFP, které se mohou použít při řízení tvarů krystalů ledu při přípravě zmrzliny. Tento dokument také popisuje způsob extrakce polypeptidové kompozice z mezibuněčného prostoru v rostlinách infiltrací listů extrakčním médiem, aniž dojde k porušení rostlin.

Dokument 94/03617 popisuje produkci AFP z kvasinek a jejich použití při přípravě zmrzlin. Dokument WO 96/11586 popisuje rybí AFP, které produkují mikroby.

Na několika místech v odborné literatuře se také popisuje izolace a/nebo použití rostlinných proteinů při ochraně při hlubokém zmrazení. Proteiny sloužící k ochraně při hlubokém zmrazení mají funkci chránit rostlinné membrány proti

poškození mražením. Tyto proteiny nevykazují vlastnosti inhibice rekrytalizace a nejsou proto spojovány s termíny AFP.

V publikaci Hinch, *Journal of Plant Physiology*, 1992, 140, 236-240 popisuje izolaci proteinů sloužících k ochraně při hlubokém zmrazení zelí. V publikaci Volger, *Biochimica et Biophysica Acta*, 412 (1975), 335-349 se popisuje izolace proteinů sloužících k ochraně při hlubokém zmrazování špenátu. V publikaci Boothe, *Plant Physiol* (1995), 108: 759-803 se popisuje izolace proteinů z rostliny *Brassica napus*. Věří se, že tyto proteiny mají ochranné vlastnosti při hlubokém zmrazení spíše než AFP. V publikaci Neven, *Plant Molecular Biology* 21: 291-305, 1993 se popisuje charakterizace špenátového proteinu, který vykazuje ochranné vlastnosti při hlubokém zmrazování. V publikaci Salzman, *Abstracts and Reviews of the 18th Annual Meeting of the ASEV/Eastern Section in Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 44, NO. 4, 1993 se popisuje přítomnost polypeptidů, které jsou stabilní při teplotě bodu varu, v pupenech rostliny *vitis*. Ačkoli tyto proteiny jsou analogy rybích protimrazových peptidů, jsou to proteiny vykazující ochranu při hlubokém zmrazení, ale nejde o AFP. V publikaci Lin, *Biochemical and Biophysical research Communication*, Vol. 183, No. 3, 1992, p. 1103-1108 a Lin, *Plant Physiology* (1992) 99, 519-525 se popisuje polypeptid vykazující ochranu při hlubokém zmrazení o molekulové hmotnosti 15 000 z *Arabidopsis thaliana*. V publikaci Houde, *The Plant Journal* (1995) 8(4), 583-593 popisuje kryoprotektivní proteiny z pšenice.

Doposud se však AFP neaplikovaly v běžně dostupných potravinách. Jedním důvodem jsou vysoké náklady a komplikovaný způsob získání AFP. Dalším důvodem je, že AFP se nemohou začlenit do standardní směsi, protože vykazují tendenci destabilizace během zpracování, zvláště během kroku pasterizace. Věří se, že tato destabilizace je způsobena

denaturací AFP. To je velmi dobře známý jev, který je možné běžně pozorovat u peptidů a proteinů.

V dokumentu PCT/EP97/03634 se píše, že AFP se mohou izolovat s přirozených zdrojů, jako je tráva aklimatizovaná na nízké teploty, novým relativně jednoduchým způsobem. Tento způsob nejdříve vede k identifikaci AFP, který se běžně s výhodou může přidat do směsi pro přípravu zmrazených produktů před jejich pasterizací.

Tento postup získání AFP z trávy zahrnuje kroky:

- a) izolace šťávy, která obsahuje AFP, z trávy,
- b) ošetření trávy nebo šťávy, která obsahuje AFP, při teplotě alespoň 60 °C,
- c) odstranění nerozpustných frakcí.

Krok popsaný v odstavci C) obvykle probíhá po krocích popsaných v odstavci a) a b). Krok popsaný v odstavci a) a b) se může provést v libovolném požadovaném pořadí. Například krok a) je následován krokem b) (v tomto případě šťáva bohatá na AFP se zahřeje) nebo krok b) je následován krokem a) (v tomto případě se zahřeje přirozený zdroj) nebo krok a) a b) probíhají současně.

Tento proces má řadu výhod. Za prvé, za použití tohoto postupu není nutné bránit porušení trávy, jak tomu je u postupu, který se popisuje v dokumentu WO 92/22581. To bezprostředně podstatně zvyšuje komerční aplikovatelnost postupu ve srovnání například s postupem popsaným v dokumentu WO 92/22581, protože nejsou nezbytné vysoké náklady na specifické zpracování. Také za použití vysokých teplot je možné extrahovat z velké skupiny peptidů přítomných v trávě AFP, které jsou velmi aktivní při inhibici rekrystalizace ledu. Za třetí na rozdíl od očekávaného, při použití vysokých teplot nedochází k denaturaci všech proteinových materiálů, ale zdá se, že denaturují jen některé proteiny, zatímco zbývající AFP trávy vykazují zvýšenou stabilitu vůči teplotě. To umožňuje zahrnout izolované AFP do kompozic, které je nutné

vystavit působení vysokých teplot, například při pasterizaci. To je zvláště překvapující, protože AFP z dokumentu WO 92/22581 se nejeví být stabilní při zahřívání.

Postup popsany shora v textu zahrnuje v kroku popsáném v odstavci b) zahřátí trávy nebo šťávy bohaté na AFP na teplotu více než 60 °C. Upřednostňuje se, že teplota se pohybuje v rozmezí 60 až 110 °C, více se upřednostňuje, aby se teplota pohybovala v rozmezí 80 až 105 °C. Zahřívací krok probíhá po izolaci šťávy bohaté na protein (krok popsany v odstavci a)) nebo před izolací uvedené šťávy. Může se použít libovolný vhodný způsob zahřátí šťávy, zahřátí v přidaném extrakčním médiu, zahřátí parou atd..

Jestliže se používá extrakční médium, přednostně se může použít v malých objemech, aby se zabránilo nezbytnému ředění frakce AFP. Může se použít libovolné vhodné extrakční médium, ačkoli se zvláště preferuje použití vody. Jestliže je to nutné, mohou se do vody přidat přísady dříve než se použijí jako extrakční médium. Nejvíce se preferuje použití vody, která je bez přísad.

Zjistilo se, že tímto způsobem lze získat z trávy velmi aktivní AFP. Podle vynálezu do názvu tráva se zahrnují členy rodiny Gramineae, která například zahrnuje víceleté trávy, jako je *Lolium perenne*, *Parapholis strigosa*, *Nardus strica*, *Catapodium loliaceum* a *Lolium multiflorum*, *Poa trivialis*, *Poa pratensis* a obilniny, jako je ozimé žito a ozimý ječmen. Stanovila se aminokyselinová sekvence AFP.

Podstata vynálezu

Překvapivě se zjistilo, že velmi aktivní AFP, které se získaly z rostlin, se charakterizují vysokým množstvím aminokyselin: serin (S), ^utreonin (T) a asparagin (N). Dále se zjistilo, že preferované AFP podle vynálezu se charakterizují tím, že alespoň 40 % aminokyselin v proteinu se vybralo ze skupiny zahrnující S, T a N. Upřednostňuje se, aby se AFP získaly z travin, zvláště z rodiny Gramineae.

Preferovaná molekulová hmotnost AFP podle vynálezu je 8 000 až 16 000, více se preferuje 10 000 až 14 000, přičemž tato molekulová hmotnost se stanovila z genové sekvence nebo hmotnostní spektroskopii nemodifikované formy, například ve formě, která není glykosylována.

Vynález se dále týká AFP, kterou je možné získat z trávy, přičemž uvedený AFP vykazuje aminokyselinovou sekvenci (od N-konce):

D-E-Q-P-N-T-I-S-G-S-N-N-T-V-R-S-G-S-K-N-V-L-A-G-N-D-N-T-V-

I-S-G-D-N-N-S-V-S-G-S-N-N-T-V-V-S-G-N-D-N-T-V-T-G-S-N-H-V-

V-S-G-T-N-H-I-V-T-D-N-N-N-N-V-S-G-N-D-N-N-V-S-G-S-F-H-T-V-

S-G-G-H-N-T-V-S-G-S-N-N-T-V-S-G-S-N-H-V-V-S-G-S-N-K-V-V-T-

D-A

Vynález také zahrnuje proteiny, které mají sekvenci s vysokým stupněm podobnosti se shora uvedenou sekvencí. Vynález dále popisuje všechny RI aktivní proteiny, které mají aminokyselinovou sekvenci vykazující alespoň 80 % překryv se shora popsanou sekvencí. Více se preferuje alespoň 90 % překryv, nejvíce se preferuje více jak 95 % překryv, například aminokyselinové sekvence, které se buď od shora popsané sekvence neliší nebo se liší pouze dvěma aminokyselinami. Takové izoformy shora uvedeného proteinu jsou předmětem vynálezu.

Vynález dále popisuje upravené verze shora popsaných proteinů, přičemž uvedené úpravy materiálně neovlivňují inhibiční vlastnosti rekrytalizace ledu. Takovou formou je například jejich glykosylovaná verze.

Štáva bohatá na AFP se může separovat z trávy, libovolným vhodným způsobem, například stlačením, filtrací, homogenizací,

extrakcí atd.. Upřednostňuje se, aby se tráva, dříve než se sesbírá frakce bohatá na protein, nasekala na malé kousky nebo se připravila kaše. Macerace je možné provést libovolným vhodným způsobem, například v mixéru. Odborník je schopný připravit trávu tak, aby mohl jednoduše proběhnout krok zachycení šťávy bohaté na proteiny.

Po zachycení uvedené šťávy a zahřátí (v požadovaném pořadí) proteinová frakce výsledného vzorku obsahující AFP se pak může zpracovat vhodným způsobem, aby se odstranila nerozpustná frakce a zbyla jen kapalná frakce bohatá na AFP. Nerozpustná frakce se může například odstranit filtrací, srážením atd.. Kapalina bohatá na AFP se pak může výhodně zpracovat tak, že se zvýší její koncentrace nebo se izolují AFP, čímž se přivedou do formy vhodné pro další použití. Příklady vhodného zpracování jsou sušení, přičemž se získá prášek nebo pasta, při koncentraci se získá koncentrát AFP, dále chromatografie, kdy se separují AFP z extrakčního média atd.. Pro odborníka je jednoduché stanovit vhodné způsoby a podmínky pro správnou izolaci.

Také se stanovila sekvence nukleové kyseliny, která kóduje shora popsaný AFP. Vynález dále popisuje sekvenci nukleové kyseliny schopnou kódovat AFP podle vynálezu.

Upřednostňuje se, aby uvedená nukleová kyselina měla sekvenci:

```
GAT GAA CAG CCG AAT ACG ATT TCT GGG AGC AAC AAT ACT GTC AGA
TCC GGG AGC AAA AAT GTT CTT GCT GGG AAT GAC AAC ACC GTC ATA
TCT GGG GAC AAC AAT AGT GTG TCT GGG AGC AAC AAC ACT GTC GTA
AGT GGG AAT GAC AAT ACC GTA ACC GGC AGC AAC CAT GTC GTA TCA
GGG ACA AAC CAT ATC GTT ACA GAC AAC AAC AAT AAC GTA TCC GGG
AAC GAT AAT AAT GTA TCC GGG AGC TTT CAT ACC GTA TCC GGG GGG
CAC AAT ACT GTG TCC GGG AGC AAC AAT ACC GTA TCT GGG AGC AAC
CAC GTT GTA TCT GGA AGC AAC AAA GTC GTG ACA GAC GCT TAA
```

Vynález dále se popisují alely nebo jiné sekvence nukleové kyseliny, které jsou schopny kódovat shora popsané AFP. Jsou to například ty sekvence nukleové kyseliny, kde ve shora uvedené sekvenci jeden nebo více kodonů je nahrazeno jejich synonymy (to je kodony kódujícími stejnou aminokyselinu).

Vynález dále popisuje vektory, které obsahují sekvenci nukleové kyseliny schopnou kódovat AFP podle vynálezu.

Na základě shora uvedených informací je také možné geneticky modifikovat jiné přirozené zdroje tak, že produkují AFP.

Také se zjistilo, že AFP shora uvedené sekvence vykazuje zdokonalené inhibiční vlastnosti rekrystalizace ledu. V příkladech se popisuje vhodný test pro stanovení inhibičních vlastností rekrystalizace. Zahrnuje rychlé zmrazení na teplotu -40°C , pak následuje uchovávání při teplotě -60°C . Přednostně AFP, které jsou po ošetření teplem vystaveny uvedenému testu, jsou ve formě krystalových částice ledu, jejichž velikost je méně než o $5\text{ }\mu\text{m}$ větší než je velikost ledových krystalů ve vzorku, kam se přidal stejný AFP, ale vzorek nebyl upraven teplem. Upřednostňuje se, aby rozdíl byl menší než $3\text{ }\mu\text{m}$, nejvíce se preferuje aby rozdíl byl menší než $1\text{ }\mu\text{m}$.

Přednostně se vyberou ty AFP, které vykazují podstatné inhibiční vlastnosti rekrystalizace ledu. Vhodný test pro stanovení inhibičních vlastností rekrystalizace se popisuje v příkladech. Upřednostňuje se, aby AFP podle vynálezu poskytovaly ledové částice po inhibičním testu rekrystalizace ledu, jak se popisuje v příkladech, o velikosti $15\text{ }\mu\text{m}$ nebo méně. Více se upřednostňuje, aby velikost částic byla od 5 do $15\text{ }\mu\text{m}$.

AFP podle vynálezu se může s výhodou použít v potravinářských produktech, přičemž se upřednostňují potravinářské produkty, které jsou zmrazené nebo jsou určeny ke zmrazení. Zvláště preferované je použití AFP v produktech,

které se před zmrazením zahřívají, například při pasterizaci, blanšírování nebo sterilizaci. Zvláště se preferuje použití ve zmrazených cukrářských produktech.

Příklady takových produktů jsou: zmrazené cukrářské směsi, jako jsou zmrzlinové směsi, které se před zmrazením pasterizují. Takové směsi se obvykle skladují při teplotě okolí. Vhodné formy produktu jsou například prášková směs, která se balí například do sáčku nebo do taštiček. Uvedená směs je schopna tvořit základ zmrazeného potravinářského produktu, například po přidání vody a jiných přísad a po možném provzdušnění.

Jiným příkladem vhodné směsi může být kapalná směs (kterou je možné provzdušnit), kterou je možné po přidání dalších složek a aeraci zmrazit.

Zřejmou výhodou shora uvedených směsí je, že přítomnost AFP umožňuje zmrazení této směsi za podmínek, kdy není nutné míchání, například v obchodě nebo v domácím mrazáku, aniž dojde k vytvoření nepříjemných tvarů ledových krystalů a struktury, která se liší od struktury produktů získaných rychlým zmrazením.

Je velmi výhodné balit tuto směs do kontejnerů (například krabic, pytlíků, plastových kontejnerů atd.). V případě jediné porce je obecně velikost balení 10 až 1 000 g. V případě více porcí je velikost balení až 500 kg. V obecném případě velikost balení je 10 g až 5 000g.

Jak se uvádí shora v textu preferované produkty, kde se používají AFP, jsou zmrazené cukrářské výrobky, jako je zmrzlina. Množství AFP je s výhodou 0,00001 až 0,5 (hmotn.) % konečného produktu. Jestliže se používají suché směsi nebo koncentráty, koncentrace AFP musí být vyšší, aby bylo jisté, že množství konečného produktu je ve shora uvedeném rozmezí.

Pro účely vynálezu termín „zmrazený cukrářský výrobek“ zahrnuje zmrazené cukrovinky, jako je zmrzlina, zmrazený jogurt, zmrazený šerbet, sorbet, mléčná zmrzlina a vaječný

mrazený krém, vodové zmrzliny a zmrazené ovocné pyré. V některých případech se méně preferuje použití ve fermentovaných potravinářských produktech.

Je výhodné, aby množství pevných látek ve zmrazených cukrářských produktech (například cukr, tuk, příchutě) bylo vyšší než 4 % (hmotn.). Například, aby množství bylo vyšší než 30 % (hmotn.), více se preferuje množství od 40 do 70 % (hmotn.).

Zmrazené cukrářské produkty podle vynálezu se mohou produkovat libovolným způsobem vhodným pro produkci zmrazených cukrářských výrobků. Je zvláště výhodné, aby se všechny ingredience před pasterizací a zmrazováním úplně smíchaly. Proces mrazení s výhodou zahrnuje tvrdnutí například při teplotě $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

Izolace AFP, kdy se nejdříve tráva zahřeje, pak se izoluje šťáva s vysokým obsahem AFP a z ní se izoluje AFP.

V lednu se nařezala tkáň různých trav (*Poa trivialis*, *Lolium perenne*, *Holcus lanatus*, *Bromus sterilis*) (průměrná teplota v tomto měsíci je $3,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se zabezpečila vhodná aklimatizace rostlin na chladno). Travní tkáň se rychle transportovala do laboratoře za účelem dalšího zpracování. Promyla se vodou, aby se odstranily nečistoty.

Nařezaná tráva o hmotnosti 500 g se umístila do mikrovlnné trouby o výkonu 659 Wattů a zahřívala se na plný výkon po dobu 5 minut, přičemž teplota vzrostla na 85 až $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nařezaná tráva se pak ochladila na teplotu okolí.

V jiném případě se kousky trávy smíchaly s 500 g vroucí vody a směs se znovu zahřála na teplotu $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, pak následovalo zahřívání po dobu 10 minut za stálého míchání a pak došlo k ochlazení na teplotu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po zahřátí se od nasekané trávy oddělila šťáva bohatá na AFP filtrací. Hmota se kontinuálně míchala po dobu 5 minut v přítomnosti stejného objemu vody a protlačila se přes tři vrstvy gázy.

Supernatant se může sušit zmrazením, aby se odstranila voda, a pak se uskladní. V jiném případě se může supernatant za účelem uchovávání zmrazit.

Příklad 2:

Kapalná směs vhodná pro přípravu zmrzliny se připravila smícháním:

ingredience	% (hmotn.)
odtučněné práškové mléko	10,00
sacharóza	13,00
maltodextrin (MD40)	4,00
guma ze svatojánského chleba	0,14
máslový olej	8,00
monoglycerid (palmitát)	0,30
vanilin	0,01
AFP (popisuje se v příkladu I*)	0,01 nebo žádný (kontrola)
voda	rovnováha

*poznámka: AFP se přidá jako koncentrovaný roztok AFP v malém množství vody, procento se vztahuje k množství AFP.

Ingredience se smíchaly při teplotě okolí, pak následovala pasterizace po dobu 60 vteřin při teplotě 89 °C. Směs se asepticky naplnila do sáčků o objemu 500 ml. Sáčky se zatavily a skladují se při teplotě okolí.

Směs se používá pro přípravu zmrzliny našleháním vhodným domácím mixérem, pak následuje zmrazení v domácím mrazáku, aniž je nutné míchání.

Po dvou měsících skladování podle vynálezu měla směs znatelně lepší strukturu, než kontrolní vzorek.

Příklad 3:

Inhibiční vlastnosti rekrystalizace ledu AFP se mohou stanovit následujícím způsobem.

Vzorek produktu obsahující AFP se upravil tak, aby množství sacharózy bylo 30 % (hmotn.) (jestliže počáteční množství vzorku je vyšší než 30 %, pak se to provedlo ředěním, jestliže počáteční množství sacharózy bylo nižší než 30 % (hmotn.) , pak se sacharóza na toto množství doplnila).

Kapka vzorku o objemu 3 μ l se umístila na 22 milimetrové krycí sklíčko. Kapka se překryla krycím sklíčkem o průměru 16 mm a aby se zaručila stejná tloušťka položilo se na vzorek závaží o hmotnosti 200 g. Hrany krycích sklíček se zalepily lakem na nehty.

Skličko se umístilo pod mikroskop s řízenou teplotou Linkham THM 600. Stolek mikroskopu se rychle ochladil (50 °C za minutu) na teplotu -40 °C za vzniku velké populace malých krystalů. Teplota stolku mikroskopu pak rychle rostla (50 °C za minutu) na -6 °C a tato teplota se udržovala.

Fáze ledu se pozorovala při teplotě -6 °C za použití mikroskopu Leica Aristoplan. Aby se zesílil kontrast ledových krystalů použilo se polarizované světlo ve spojení s deskou lambda. Stádium fáze ledu (velikost ledových krystalů) se zaznamenávala 35 mm fotomikrografií v čase $T=0$ a $T=1$ hodina.

V obecném případě tento test se může aplikovat v případě libovolné vhodné kompozice obsahující AFP a vodu. V obecném případě množství AFP v takové testované kompozici není velmi kritický a může se například pohybovat v rozmezí od 0,0001 do 0,5 % (hmotn.), více se preferuje rozmezí 0,0005 až 0,1 % (hmotn.), nejvíce se preferuje 0,001 až 0,05 % (hmotn.), například 0,01 % (hmotn.).

V testu se může použít libovolná vhodná kompozice obsahující AFP a vodu. V obecném případě není však nutné izolovat AFP v čisté formě. V případě praktického použití

postačí připravit kapalný extrakt nebo šťávu z přirozeného materiálu , přičemž tento extrakt nebo šťáva se pak mohou testovat.

Tato metoda se pak může aplikovat například na AFP obsahující extrakty, které se získaly v příkladu I, kdy se aplikoval nebo neaplikoval krok koncentrování.

Měřily se inhibiční vlastnosti rekrystalizace několika vzorků. U šťávy obsahující AFP, která se získala po extrakci a zahřátí podle příkladu I, se měřily její rekrystalizační vlastnosti, jak se uvádí shora v textu.

Ze Silsoe (UK) se získal extrakt z trávy sklizené v měsíci lednu, který nebyl ošetřen teplem. Extrakt se centrifugoval po dobu jedné hodiny, aby se odstranila půda a nerozpustné nečistoty (centrifuga: Sorvall RC3C, rotor: H6000A, teplota: +5°C, rychlost 5 000 ot./min., 7 268 xg).

Vzorek extraktu se sušil zmrazením, aby se stanovil celkový obsah pevných látek. Zjistilo se, že tato hodnota je 11,48 mg/ml. Suchý extrakt se pak znovu hydratoval 30 % roztokem sacharózy na jeho původní koncentraci pevných látek. Ředěním extraktu 30 % roztokem sacharózy se připravilo několik roztoků.

Inhibiční aktivita rekrystalizace krystalů ledu se měřila za použití testu, který se popisuje shora v textu.

V čase $T=0$ a $T=1$ testy inhibice rekrystalizace ukázaly průměrnou velikost krystalů ledu měřené za použití analyzátoru Zeiss TGA 10. Velikost ledových krystalů (délka) se stanovila obkreslením krystalů. Maximální délka v případě každého jednotlivého krystalu ledu sádky zmrzliny se přenesla do tabulkového procesoru , kde se data analyzují a zjišťuje se průměrná a standardní odchylka.

Získané výsledky se uvádějí v tabulce dále v textu:

vzorek	celkové pevné látky (mg/ml)	velikost krystalů ledu (μm)		růst ledových krystalů během jedné hodiny při teplotě -6 $^{\circ}\text{C}$ (μm)
		T=0	T=1 hodina při teplotě -6°C	
neředěný	11,48	5,2	7,3	2,1
50 % extrakt	5,74	5,5	7,6	2,1
25 % extrakt	2,87	6,3	8,9	2,6
12,5 % extrakt	1,435	6,6	13,1	6,5
6,25 % extrakt	0,7175	8,1	14,7	6,6
3,125 % extrakt	0,359	7,4	17,0	9,6
1,5625 % extrakt	0,179	9,0	20,3	11,3

Tyto výsledky ukazují rozdíly velikosti konečných krystalů a změny ve velikosti krystalů během jedné hodiny při teplotě -6°C při různých ředěních extraktu trávy. Je možné vidět, že množství pevných látek v extraktu trávy může kolísat v širokém rozmezí, zatímco je možné získat stále dobré inhibiční vlastnosti rekrystalizace. Přednostně se vybírají ty koncentrace, kde výsledkem jejich použití je velikost krystalů ledu po jedné hodině 15 mikrometrů nebo méně.

Podobný test se provedl s extraktem trávy, který se vystavil ošetření teplem (10 minut při teplotě 100°C). Nebylo

možné spatřit žádné podstatné snížení inhibičních vlastností rekrystalizace.

Navíc extrakty trávy podle příkladu I se testovaly za použití stejného inhibičního testu rekrystalizace. Získaly se následující výsledky:

ošetření teplem	velikost krystalů	
	T=0	T=1
60 °C po dobu 1 hodiny	9,6	11,1
var 10 minut	9,8	11,3

Tyto výsledky ukazují, že dokonce po zahřátí extraktu trávy aklimatizované na chlad, se zachovaly schopnosti inhibovat růst krystalů ledu.

Příklad 4:

Semena víceletého jílku (*Lolium perenne*) se získala u firmy Barenbrug (UK) Ltd. Tato semena se zasela do květináčů o průměru 22,5 cm s kompostem Levingston č. 2 a po oplození, ke kterému většinou dochází mezi 4 až 7 dnem po zasazení. Rostliny rostly ve skleníku po dalších 7 až 10 dní, až dosáhly velikosti přibližně 15 až 20 cm. Rostliny se pak přenesly do chladné místnosti, aby došlo k jejich aklimatizaci na chlad. Aklimatizace probíhala po dobu 30-ti dní při teplotě +4 °C při 8-16 hodinách světla/tmy.

Listy rostliny aklimatizované na chlad se odřízly a homogenizovaly se v 50 mM Tris, 10 mM EDTA, přičemž se upravila hodnota pH koncentrovanou HCl. Homogenizace se provedla po dobu 2x 30 vteřin v mixéru Waring, kdy poměr pufu a listů je 2,5 : 1 (hmotn.)

Homogenát se pak umístil do lázně s vroucí vodou po dobu 10 minut a nechal se protéct vrstvami gázy. Sebraný

supernatant se dále centrifugoval při 15 000 xg na rotoru 8 x 50 ml centrifugy Sorvall.

Rekrytalizační vlastnosti ledu se testovaly způsobem, který se popisuje v příkladu 3.

Extrakt stabilní vůči teplu (10 až 50 ml) se koncentroval přibližně desetkrát na zařízení Amicon za použití membrány PM10. Alikvoty o objemu 1 ml se odsolily na koloně „Fast Desalting Column“ v separačním systému FPLC (Pharmacia). Kolona pracovala při průtoku 1 ml/min v 50 mM Tris/Cl, 10 mM EDTA, pH8,5. Sbírání frakcí (objem 1 ml) se začalo, když se hodnota O.D. při vlnové délce 280 nm začala zvyšovat. Aktivní frakce RI se slily do objemu 3 ml.

Vzorky s aktivitou RI se nanasly na kolonu Mono Q (HR5 x 5), která se uvedla do rovnováhy stejným pufrům Tris pH 8,5. Výstup se shromáždil jako jediná frakce a kolona se bezprostředně eluovala lineárním gradientem s koncentrací 0 až 0,25 M NaCl po dobu 25 minut při průtoku 1 ml/min. Zjistilo se, že celá aktivita zůstává nenavázaná a eluovala se do průchozí frakce.

Hodnota pH průchozí frakce se opatrně nastavila na hodnotu pH 9,5 za použití kapek o objemu jednoho mikrolitru 4M NaOH a frakce se nanasla na kolonu Mono Q, která se znovu uvedla do rovnováhy pufrům Tris s hodnotou pH 9,5. Průchozí frakce se shromáždila jako jediná frakce a pak se kolona bezprostředně eluovala lineárním gradientem NaCl při koncentraci 0 až 0,25 M během 25 minut. Rychlost průtoku je 1 ml/min. Frakce o objemu 1 ml se shromáždily a provedl se RI test. Zjistilo se, že celá RI aktivita zůstala navázaná na koloně a v průchozí frakci se nezjistila žádná aktivita. Aktivita se eluovala jako jediný pík mezi 0,08 a 0,14 M NaCl.

Aktivní frakce získané z kolony Mono Q se slily a koncentrovaly se na objem 50 mikrolitrů na zařízení PM10 Centricon a nanasly se na kolonu Sephadex 75 v systému Smart (Pharmacia). Kolona se uvedla do rovnováhy pufrům 50 mM

Tris/Cl pH 9,5 a průtoková rychlost byla 50 μ l/min. Po vypuštění objemu 1 μ l z kolony, aby se odstranil mezerový prostor kolony, se shromáždilo 50 ml frakcí. Aktivní frakce se testovaly na SDS PAGE.

Vzorky se pak testovaly na 10 % Nu Page gelech od firmy Novex. Vzorky a gelový pufr se připravily způsobem, který se popisuje v instrukcích výrobce a gely se barvily za použití barvicí sady stříbrem firmy Novex. Aktivní frakce obsahují jediný obarvený pruh proteinu se zjevnou molekulovou hmotností 29 000.

Vzorky proteinu se také oddělily pomocí SDS PAGE, pak následuje elektroblotování na PVDF membránu, což se zakládá na metodě Matsudaira v 10 mM pufru Caps, pH 11,0 a 10 % metanolu. Membrána se zvlhčila metanolem a pak se uvedla do rovnováhy pufrům Caps po dobu 10 minut. Blotování probíhalo po dobu 16 hodin při konstantním napětí 20 voltů. Po blotování se proteiny zviditelnily obarvením membrány 0,2 % brilantovou modří podle Coomassie v 50 % metanolu, 1 % kyselině octové po dobu 1 minuty. Membrána se pak odbarvovala 50 % metanolem do té doby, pokud pruhy proteinu byly jasně viditelné. Membrána se promyla vadou Milli Q, sušila se na vzduchu a uchovávala se při teplotě -20 °C.

N-konec pruhu o velikosti 29 000 se sekvenoval použitím běžných metod, které poskytují aminokyselinovou sekvenci.

Protein o molekulové hmotnosti 29 000, jehož RI aktivita se považuje za tolerantní vůči teplotě varu, se imobilizoval na membránu PVDF po separaci na SDS PAGE. N-konec tohoto proteinu se sekvenoval a úspěšně se sekvenovalo 15 prvních 17 zbytků. Protein o molekulové hmotnosti 27 000 izolovaný z rostliny *Poa pratensis* se také sekvenoval na svém N-konci (tabulka č. 1) a ukázalo se, že vykazuje stejnou sekvenci, která naznačuje, že je součástí stejné rodiny proteinů. To předpokládá, že existuje jediná třída AFP odpovědná za toleranci RI aktivity vůči teplotě varu u Gramineae.

Tabulka č. 1

Uspořádání sekvencí N-konce RI aktivního proteinu o molekulové hmotnosti 29 00, který pochází z *Lolium perenne* a proteinu o molekulové hmotnosti 27 000 z rostliny *Poa pretensis*.

Lolium	-D E Q P N T I S G X N N T V R X G
Poa	-A E T P N T I S G T N N

Příklad 5:

Počáteční extrakce proběhla se směsí 1:1 fenol a chloroform, pak následovala extrakce pouze s chloroformem. Fenol denaturuje proteiny, které vystavují jeho působení hydrofóbní aminokyselinové zbytky, které umožňují proteinu přejít do organické fáze. Více hydrofilní nukleové kyseliny a sacharidy tvoří součást vodní fáze. Proteiny s podstatným stupněm glykosylace tvoří součást fázového rozhraní. Chloroform působí jako dělicí činidlo proteinů účinněji, když se použijí dvě odlišná organická rozpouštědla a konečná extrakce chloroformem odstraní zbývající stopy fenolu.

Z listů rostlin *Lolium perenne* se připravil tepelně stabilní extrakt a jeho koncentrace se zvýšila přibližně desetkrát za použití ultrafiltrační komůrky Amicon s membránou, která odděluje molekuly o molekulové hmotnosti 10 000. Výsledný koncentrát (o objemu 0,05 ml) se nanese na gelovou filtrační kolonu Superdex 75 PC 3,2/30, která funguje na základě mikroseparačního systému Smart (Pharmacia). Kolona se eluovala pufrům 50 mM Tris/Cl pH 9,5 a s rychlostí průtoku 0,05 ml/min a sbíraly se frakce o objemu 0,05 ml. U jednotlivých frakcí se testovala inhibiční aktivita rekrytalizace ledu a nejvíce aktivní frakce se spojily dohromady. Ty se pak nanese na kolonu Mono Q PC 1,6/5, která se uvedla do rovnováhy pufrům 50 mM Tris/Cl s hodnotou pH 9,5, která také funguje na základě systému Smart. Průtoková rychlost je 0,1 ml/min. Po nanesení a promytí se kolona

eluovala lineárním gradientem chloridu sodného s koncentračním gradientem 0 až 0,4 M a sesbíraly se frakce o objemu 0,1 ml. Frakce se testovaly a aktivita se eluovala jako jediný pík při přibližné koncentraci chloridu sodného 0,1 M.

Aktivní frakce se míchaly na vortexu se stejným objemem fenol:chloroform:izoamylalkohol (1:1(24:1)) po dobu 1 minuty. Vodná (horní) a organická (spodní) fáze se odděleně sebraly, aniž bylo viditelné fázové rozhraní. Dvě fáze se pak srážely přidáním deseti objemů chladného acetonu a vše se uchovávalo při teplotě -20 °C po dobu 16 hodin. Výsledný pelet se resuspendoval v pufru 50 mM Tris/Cl a ve vzorcích se testovala RI aktivita a podrobily se testu SDS PAGE.

Test resuspendovaných frakcí ukazuje, že RI aktivita se nachází zcela ve vodné fázi. Organická fáze neobsahovala žádnou RI aktivitu dokonce ani po té, co se frakce denaturovala/renaturovala 6M hydrochloridem guanidinu. To je neočekávaný výsledek, protože protein by měl přejít do organické fáze nebo by měl glykoprotein zůstat ve fázovém rozhraní. Analýza pomocí SDS PAGE však ukázala, že ačkoli většina proteinů je v organické fázi, ve vodné aktivní frakci je jediný pruh proteinu se zjevnou molekulovou hmotností 29 000, ale žádný takový pruh není viditelný v organické fázi. Pruh se na rozdíl od jiných proteinů barvil odlišnou barvou a byl velmi difúzní.

Podobná fenol:chloroformová extrakce se provedla s extraktem, který je tolerantní vůči teplotě varu a který se připravil z listů rostlin aklimatizované na chlad, které pocházejí z luční travy (*Poa pratensis* var *Barcelona*). V extraktu také dochází k preferenčnímu rozdělení RI aktivity do vodné fáze a na SDS PAGE se objevil protein o molekulové hmotnosti 27 000.

Sekvenování N-konců proteinů potvrdilo, že jsou shodné s AFP popsány v příkladu 4.

Příklad 6:

Degenerovaný oligonukleotidový primer (Lol 1) se navrhl a syntetizoval ze sekvence N-konce proteinu (ASP-GLU-GLN-PRO-ASN-THR-ILE) jako GAYGARCARCCIAAYACIAT, kde Y=C+T, R=A+G a I je inosin.

První řetězec cDNA se připravil z 5 µg RNA listů rostliny *Lolium perenne*, která se po dobu 30 dní aklimatizovala na chlad za použití reverzní transkriptázy Superscript (firma Stratagene) a oligonukleotidového primeru OG1 (GAGAGAGGATCCTCGAG (T) 15) podle instrukcí výrobce. 1% prvního řetězce cDNA se použilo jako templát spolu s primery Lol1 a OG1 v reakci PCR. Reakce se pak provedly v termálním cykleru za použití Taq DNA polymerázy (Gibco BRL) při 30 cyklech (1 minuta, při teplotě 94 °C, 1 minuta při teplotě 55 °C a 1 minuta při teplotě 72 °C) po iniciaci denaturačního kroku po dobu 2 minut při teplotě 14 °C.

Amplifikoval se produkt PCR o velikosti přibližně 600 bp a následně se izoloval z 1% agarózového gelu a klonoval se do vektoru pTAG (R and D systems) podle instrukcí výrobce. Klonovaný produkt PCR se sekvenoval na automatizovaném sekvenátoru DNA Perkin Elmer (Applied Biosystems) za použití primerů T3 a T7. Tento produkt obsahoval otevřený čtecí rámec, který je v podstatě podobný sekvenci:

```
GAT GAA CAG CCG AAT ACG ATT TCT GGG AGC AAC AAT ACT GTC AGA
TCC GGG AGC AAA AAT GTT CTT GCT GGG AAT GAC AAC ACC GTC ATA
TCT GGG GAC AAC AAT AGT GTG TCT GGG AGC AAC AAC ACT GTC GTA
AGT GGG AAT GAC AAT ACC GTA ACC GGC AGC AAC CAT GTC GTA TCA
GGG ACA AAC CAT ATC GTT ACA GAC AAC AAC AAT AAC GTA TCC GGG
AAC GAT AAT AAT GTA TCC GGG AGC TTT CAT ACC GTA TCC GGG GGG
CAC AAT ACT GTG TCC GGG AGC AAC AAT ACC GTA TCT GGG AGC AAC
CAC GTT GTA TCT GGA AGC AAC AAA GTC GTG ACA GAC GCT TAA
```

a dedukovaná aminokyselinová sekvence je v podstatě podobná sekvenci:

D-E-Q-P-N-T-I-S-G-S-N-N-T-V-R-S-G-S-K-N-V-L-A-G-N-D-N-T-V-
I-S-G-D-N-N-S-V-S-G-S-N-N-T-V-V-S-G-N-D-N-T-V-T-G-S-N-H-V-
V-S-G-T-N-H-I-V-T-D-N-N-N-N-V-S-G-N-D-N-N-V-S-G-S-F-H-T-V-
S-G-G-H-N-T-V-S-G-S-N-N-T-V-S-G-S-N-H-V-V-S-G-S-N-K-V-V-T-
D-A

Otevřený čtecí rámec kóduje protein o molekulové hmotnosti přibližně 12 000, který je menší než je jeho zjevná molekulová hmotnost na SDS PAGE (29 000). Také se pozorovalo, že kódující sekvence také obsahuje šest glykosylačních míst (ASN-X-SER/THR) a podstatný počet zbytků SER a THR, které se mohou také glykosylovat. Tento důkaz naznačuje, že přirozený protein izolovaný z rostliny *Lolium* je vysoce glykosylovaný. Jestliže je protein enzymaticky deglykosylován stále si uchovává inhibiční aktivitu rekrystalizace ledu, což naznačuje, že glykosylace není podstatná, aby protein byl aktivní.

Příklad 7:

Aby se prokázalo, že cDNA z rostliny *Lolium* perenne popsané v příkladu 6 kóduje AFP, provedla se exprese kódující oblasti. Vytvořil se kmen *Pichia pastoris*, což je metylotrofní kvasinka, která obsahuje cDNA AFP rostliny *Lolium*.

cDNA rostliny *Lolium* se klonovala do vektoru pPIC9 se signální sekvencí faktoru α , aby se zajistilo vylučování z buněk a glykosylace. Všechny enzymy se získaly u firmy Boehringer Mannheim a použily se podle instrukcí výrobce. Konstrukce expresivních vektorů, transformace a růst kvasinek *Pichia* se provedly způsobem, který se popisuje v publikaci Invitrogen *Pichia* Expression Kit (Version B) Manual.

cDNA rostliny *Lolium* se klonovala do vektoru pPIC9, jako amplifikační fragment PCR s kompatibilními restričními konci vhodnými pro ligaci do vektoru pPIC9. To se uskutečnilo za

použití cDNA rostliny *Lolium*, jako templátu a primerů
GTATCTTCGAGAAAAGAGATGAGCAGCCGAAACAGATT a
TTAATTCGCGGCCCGCCTGTAGGAAAAGTATGGTATATC, které zavedou na
5' konec amplifikovaného fragmentu restrikční místo *Xho*I a na
jeho 3' konec restrikční místo *Not*I a tím se zajistí, že cDNA
rostliny *Lolium* je v rámci se sekrečním signálem otevřeného
čtecího rámce. Reakce se provedly v termálním cykleru za
použití Taq DNA polymerázy a čtecího enzymu Pfu (Boehringer
Mannheim) ve 30 cyklech (1 minuta při teplotě 94 °C, 1 minuta
při teplotě 55 °C a 1 minuta při 72 °C). Všechny následné PCR
reakce se provedly za stejných podmínek, ale bez enzymu Pfu.
*Xho*I/*Not*I fragment cDNA se klonoval do vektoru pPIC 9
štěpeného restrikčními enzymy *Xho*I/*Not*I a vektorem se
transformovaly kompetentní buňky *E. coli* (kmen XL1-blue). Po
transformaci se buňky nanesly na LB plotny s ampicilinem o
koncentraci 50 µg/ml a nechaly se růst při teplotě 37 °C po
dobu 16 hodin. Pak se izolovalo 20 transformantů rezistentních
na ampicilin a analyzovala se jeho začlenění cDNA z rostliny
Lolium pomocí PCR za použití primerů 5'AOX1 a 3'AOX1, které se
syntetizovaly způsobem popsáným v publikaci Invitrogen Kit
Manual.

Ze čtyř pozitivních transformantů se izolovala plazmidová
DNA minipreparační metodou a DNA se linearizovala štěpením
restrikčním enzymem *Sal*I za účelem transformace do buněk
Pichia, které se kultivují a promývají způsobem popsáným
v manuálu Invitrogen. Linearizovaná DNA se zavedla
elektroporací do buněk *Pichia* za použití zařízení GenePulser
BioRad. Po přidání ledem chlazeného 1 M sorbitolu se buňky
nanesly na MD plotny a nechaly se růst při teplotě 30 °C po
dobu 24 hodin, až vzniknou viditelné kolonie. Pak se 16
transformantů izolovalo na čerstvé MM a MD plotny a vybraly se
transformanty, které se nechaly růst na plotnách MD a na MM,
kde rostly pomaleji. Tyto transformanty se pak analyzovaly PCR

za použití 5' a 3' primerů AOX1 a u 8 pozitivních transformantů se testovala exprese.

Kolonie se inokulovaly do média BMGY a nechaly se růst při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin, pak se buňky centrifugovaly a přenesly se na médium BMMY, aby se indukovala exprese a pak se dále inkubovaly po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Metanol se přidal ještě dvakrát, aby jeho koncentrace byla 0,5 % po 24 a 48 hodinách, aby se zachovala indukce. Buňky se pak odstranily centrifugací a alikvot média se upravil tak, aby koncentrace sacharózy byla 30 % a testovala se inhibiční aktivita rekrytalizace ledu. Médium v případě všech transformantů obsahovalo podstatnou RI aktivitu, zatímco médium produkované stejným způsobem z kontrolních buněk *Pichia*, které neobsahují začleněné cDNA rostliny *Lolium* nevykazovalo žádnou aktivitu.

Shora uvedený příklad ukazuje, že protein izolovaný z rostliny *Lolium perenne* a odpovídající cDNA reprezentuje RI aktivní AFP.

Příklad 8:

Mikroorganismus *E. coli* XL-1 se použil ve všech krocích klónování. Kultury se nechaly růst na kultivačním médiu 2YT, kde jako selekční činidlo slouží ampicilin nebo kanamycin. Všechny oligonukleotidové primery se syntetizovaly na syntetizéru DNA Perkin Elmer 381A za použití fosforamiditové skupiny, jak doporučuje výrobce. Kultivační plotny se připravily nanesením 2 ml buněčné suspenze bakterií *Nicotiana bethiana* na Petriho misky, které obsahují 25 ml MS solí, B5 vitaminy (1 mg/l kyseliny nikotinové, 1 mg/l pyridoxinu, 10 mg/l thiaminu, 100 mg/l inositolu) + 1 mg/l 2-4D, 0,2 mg/l BAP + 0,8 % agaru. Buňky se promíchaly krouživým pohybem, aby pokryly celý agar a pak se překryly sterilním filtračním papírovým diskem.

Selekční médium: MS základní médium + 3 % sacharózy, 0,2 mg/l IAA, 1mg/l BAP, 0,9% agar + 500 mg/l cefotaximu + 100 mg/l kanamycinu.

Sekvence Lol1 kódující AFP a PR1a apoplastická cílená sekvence se amplifikovaly PCR s 5'a 3'oligonukleotidovými primery navrženými tak, aby vznikly vhodná restrikční místa, která jim umožňují ligaci v restrikčním místě BamHI a spojený produkt se pak začlení do plazmidového vektoru pUC otevřeného restrikčními enzymy NcoI a EcoRI (Messing 1983). Lol1 AFP se začlenila odděleně do tří vektorů pUC za různé promotorové sekvence (syntáza škrobu vázaná na granule, kvěťákový kruhový virus, dvojitý 35S kvěťákového mozaikového viru). Ty se pak dále klonovaly do rostlinného transformačního binárního vektoru a zavedly se do rostliny tabáku za použití transformace zprostředkované mikroorganizmem *Agrobacterium*.

Reakční směs pro PCR obsahovala 5 μ l 10x Taq reakčního pufru, 1 μ l dNTP, 1 μ l 5'a 3'primerů (50 pmol/ μ l), 1 μ l templátové sekvence Lol1, 0,5 μ l Taq polymerázy a 0,05 μ l enzymu Pfu. Zkumavky se směsí se překryly minerálním olejem a amplifikace probíhala ve 30 cyklech po dobu 1 minuty při teplotě 94 °C, 1 minuty při teplotě 55 °C a 1 minuty při teplotě 72 °C po iniciačním denaturačním kroku, 2 minuty při teplotě 94 °C.

Štěpení PCR amplifikačního produktu se provedlo s vhodnými restrikčními enzymy v doporučeném pufru (Boehringer Mannheim) po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C. Štěpené směsi se oddělily na 1% agarózovém gelu a relevantní pruhy se vyřízly a čistily se za použití sady vhodné pro izolaci DNA z gelu Qiagen podle návodu výrobce.

Inzert a plazmidový vektor se ligovaly T4 ligázou za použití 10x koncentrovaného pufru doporučeného firmou Stratagene po dobu 16 hodin při teplotě 16 °C. Kompetentní buňky mikroorganismu *E. coli* se transformovaly za použití 2 μ l ligační reakce, nanesly se na plotnu a nechaly se růst při

teplotě 37 °C přes noc. Transformanty se identifikovaly PCR za použití specifických 5' a 3' primerů. Plazmidová DNA se pak izolovala způsobem, který se popisuje v manuálu Maniatis v 1. dílu, a správné uspořádání se potvrdilo restrikční analýzou.

Inzerty HindIII/EcoRI se vyřízly a ligovaly se stejně jako před tím do obecného transfomačního rostlinného vektoru (GPTV) štěpeného restrikčními enzymy HindIII/EcoRI. Kompetentní buňky *E. coli* se transformovaly a transformanty se identifikovaly PCR. Správnost následně izolované plazmidové DNA se potvrdila sekvenováním.

Tři různé vektory GPTV se transformovaly odděleně do mikroorganismu *Agrobacterium tumefaciens* (kmen LBA 4404) za použití metody zmrazení/rozmrazení, jak se popisuje v publikaci Plant Molecular Biology manual PMAN A3/7.

Semena rostliny *Nicotiana tabacum* (odrůda Petit Havana) se povrchově sterilizovaly po dobu 10 minut roztokem 10 % chlornan sodný a po třikrát opakovaném promytí destilovanou vodou se přenesly na základní kultivační médium podle Murashige a Skooga s 3 % sacharózou a 0,9 % agarem. Buňky *Agrobacterium* obsahující vhodný plazmid se kultivovaly přes noc na půdě Lennox (5 g/l NaCl, 10 g/l kvasinkového extraktu, 10 g/l baktotryptonu a 15 g/l agaru), pak se buňky získaly centrifugací po dobu 10 minut při 3 000 x g a resuspendovaly se v základním médiu MS s 3 % sacharózou. Disky listů rostliny tabáku vyřezané sterilním řezákem korku se infikovaly inkubací s kulturou mikroorganismu *Agrobacterium* po dobu 10 minut. Pak se nechaly uschnout na sterilním filtračním papíře a daly se lícem dolů na kultivační plotny buněk rostlin tabáku.

Infikované disky tabáku se inkubovaly při teplotě 26 °C po dobu 2 dní při intenzitě světla 2 000 luxů a pak se přenesly do selekčního média. Tam se inkubovaly při intenzitě světla 3 000 luxů po dobu 26 °C a 16 hodin, přičemž pak následuje osmi hodinový cyklus tmy. Každé dva týdny se přenesly do čerstvého média. Když se na hraně disku objevily nové výhonky přenesly

se do MS základního média s 3 % sacharózou, 500 mg/l cefotaximu a 100 mg/l kanamycinu, aby zakořenily.

Po zakořenění a růstu do velikosti, kdy mají 3 až 4 listy, se listy z několika linií každé konstrukce plus několika netransformovaných kontrolních rostlin odstranily za účelem provedení testu RI. Tkáň listů se rozdrtila do ependorfy a uvolněná šťáva se získala centrifugací. Šťáva se upravila, dříve než se provedl test, 30 % sacharózou (hmotnost/objem).

Ukázalo se, že několik rostlinných linií z každé konstrukce má podstatné množství inhibiční aktivity rekrytalizace ledu. Extrakty z každé kontrolní rostliny nevykazují žádnou aktivitu. To jasně ukazuje, že Lol1 AFP se transformoval do buněk rostliny tabáku, které nemají svůj vlastní AFP. Tento protein se úspěšně exprimuje jako aktivní protein a rostlinu není nutné aklimatizovat na chlad.

Rostliny, které se vybraly k další kultivaci se umístily do květináčů s 50 % perlitem/50 % směs rašeliny a nechaly se růst do vzniku květenství při teplotě 26 °C při 16 hodinové periodě světla/při teplotě 22 °C při 8 hodinách tmy. Květy se přikryly, aby se zajistilo samoopylení a semena se sebraly a uchovávaly se při teplotě +4 °C.

Příklad 9:

Aby se prokázalo, že AFP podle vynálezu nevyžadují pro svou aktivitu glykosylaci, kódující oblast se exprimovala v prokaryontním systému. Vytvořil se kmen bakterie *E. coli*, který obsahuje cDNA AFP rostliny *Lolium*.

cDNA rostliny *Lolium* se klonovala do plazmidu pET32 od firmy Novagen, který obsahuje thioredoxin vhodný pro expresi cílového genu jako fúzního proteinu. Všechny použité enzymy jsou od firmy Boehringer Mannheim a používají se podle doporučení výrobce. Konstrukce expresivních plazmidů, transformace a růst buněk *E. coli* proběhly způsobem, jak se

popisuje v manuálu Novagen pET systém a v průvodci Promega Applications.

cDNA rostliny *Lolium* se klonoval do plazmidu pET-32, jako fragment vzniklý amplifikací PCR s kompatibilními restrikčními konci vhodnými pro ligaci do vícenásobného klónovacího místa plazmidu pET-32. Fragment vznikl za použití cDNA rostliny *Lolium* jako templátu a 5'oligonukleotidového primeru (TTTGCGCTCGAGTTAAGCGTCTGTCACGACTTTG) a 3'oligonukleotidového primeru (TTTGCGCCATGGATGAACAGCCGAATACGATTTC). Tímto způsobem se zavedlo restrikční místo NcoI na 5'konec a XhoI na 3'konec amplifikovaného fragmentu. Reakce se provedly v tepelném cykleru za použití Taq DNA polymerázy v 25 cyklech (denaturace při teplotě 94°C, teplotní hybridizace při teplotě 35 °C až 60 °C, exprese při teplotě 72 °C). Všechny následné reakce PCR se provedly za stejných podmínek. NcoI/XhoI PCR amplifikovaný fragment se pak klonoval do plazmidu pET-32 štěpeného restrikčními enzymy NcoI/XhoI a transformoval se do kompetentních buněk bakterie neexprimujících *E. coli* (kmen XL1-Blue). Po transformaci se buňky nanosly na plotny s LB médiem a s ampicilinem a nechaly se kultivovat při teplotě 37 °C po dobu 16 hodin. Izolovalo se 10 transformantů rezistentních na ampicilin a analyzovalo se začlenění cDNA rostliny *Lolium* pomocí PCR za použití upstream a downstream primerů pET od firmy Novagen.

Za použití metody v malém objemu se izolovala plazmidová DNA ze tří pozitivních transformantů a štěpila se restrikčními enzymy XhoI a NcoI za účelem transformace do kompetentních exprimujících buněk bakterie *E. coli* BL21(DE3), jak se popisuje v manuálu pro systém pET. Transformované buňky se nanosly na plotny s LB kultivačním médiem s ampicilinem a inkubovaly se po dobu 37 °C po dobu 24 hodin spolu s kontrolou připravenou z netransformovaných buněk bakterií *E. coli* BL21(DE3).

Vybraly se tři pozitivní transformované kolonie a subkultivovaly se v LB kultivačním médiu s ampicilinem a inkubovaly se při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny, aby se dosáhlo hodnoty O.D. ($\lambda=600$ nm) 0,6 a pak se inokuloval velký objem média a vše se míchalo při teplotě 37 °C. Když hodnota O.D. dosáhla hodnoty 0,5 buňky se indukovaly IPTG, aby došlo k expresi po dobu 3 hodin, jak se popisuje v manuálu systému pET.

Exprimované proteiny se izolovaly z cytoplazmy buněk *E. coli*, jak se popisuje v manuálu systému pET. Buňky se sklídily centrifugací, resuspendovaly se v pufru HEPES (25 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH7,5) a sonikovaly se po dobu 10 vteřin. Frakce cytoplazmatického proteinu se centrifugovala a shromáždil se supernatant. Alikvot supernatantu se upravil 30 % sacharózou a testovala se inhibiční aktivita rekrystalizace ledu, jak se popisuje v příkladu 3. Extrakt cytoplazmatického proteinu vykazuje podstatnou aktivitu RI, zatímco extrakt cytoplazmatického proteinu produkovaný stejným způsobem z kontrolních buněk bakterií *E. coli* nesoucí integrované cDNA rostliny *Lolium* nevykazuje žádnou aktivitu.

Fúzní protein se čistil na koloně na základě afinity ke kovu a thioredoxin se odstranil štěpením trombinem. Identita štěpeného AFP se potvrdila sekvenováním N-konce a ukázalo se, že tento štěpený protein vykazuje podstatnou inhibiční aktivitu rekrystalizace ledu.

Tato skutečnost popsaná shora v textu dokazuje, že neglykosylovaný protimrazový protein rostliny *Lolium perenne* exprimovaný v mikroorganismu *E. coli* si uchovává inhibiční aktivitu rekrystalizace, ať už je ve formě fúzního produktu s thioredoxinem nebo po jeho štěpení trombinem.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Protimrazový protein, který se může získat z rostlin, se charakterizuje tím, že alespoň 40 % ^{jejich} aminokyselin je ze skupiny serin, ^Wtreonin a asparagin a vykazuje alespoň 80 % překryv s následující aminokyselinovou sekvencí:

D-E-Q-P-N-T-I-S-G-S-N-N-T-V-R-S-G-S-K-N-V-L-A-G-N-D-N-
T-V-I-S-G-D-N-N-S-V-S-G-S-N-N-T-V-V-S-G-N-D-N-T-V-T-G-
S-N-H-V-V-S-G-T-N-H-I-V-T-D-N-N-N-N-V-S-G-N-D-N-N-V-S-
G-S-F-H-T-V-S-G-G-H-N-T-V-S-G-S-N-N-T-V-S-G-S-N-H-V-V-
S-G-S-N-K-V-V-T-D-A

stejně jako upravené verze tohoto proteinu, přičemž uvedená úprava ^{proteinu} materiálně neovlivňuje ^{protein} inhibiční vlastnosti rekrystalizace ledu.

2. Protimrazový protein podle nároku 1, který je možné získat z trávy.
3. Protimrazový protein podle nároku 1, kde překryv je alespoň 95 %.
4. Protimrazový protein podle nároku 1, kde překryv je 100 %.
5. Protimrazový protein podle nároku 1, kde se protein upravil glykosylací.
6. Sekvence nukleové kyseliny schopné kódovat protimrazový protein podle nároku 1.
7. Sekvence nukleové kyseliny podle nároku 6

GAT GAA CAG CCG AAT ACG ATT TCT GGG AGC AAC AAT ACT GTC
AGA TCC GGG AGC AAA AAT GTT CTT GCT GGG AAT GAC AAC ACC
GTC ATA TCT GGG GAC AAC AAT AGT GTG TCT GGG AGC AAC AAC
ACT GTC GTA AGT GGG AAT GAC AAT ACC GTA ACC GGC AGC AAC
CAT GTC GTA TCA GGG ACA AAC CAT ATC GTT ACA GAC AAC AAC
AAT AAC GTA TCC GGG AAC GAT AAT AAT GTA TCC GGG AGC TTT
CAT ACC GTA TCC GGG GGG CAC AAT ACT GTG TCC GGG AGC AAC
AAT ACC GTA TCT GGG AGC AAC CAC GTT GTA TCT GGA AGC AAC
AAA GTC GTG ACA GAC GCT TAA

a její alely.

8. Mražený potravinářský produkt, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje protimrazový protein podle nároku 1.
9. Potravinářský produkt podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je mražený cukrářský produkt.
10. Způsob získání AFP podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e AFP produkuje geneticky upravený organizmus.
11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e organizmus je mikroorganizmus nebo rostlinná linie.