

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

450-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11. 08. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.08.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/695412**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 07. 99**
(**Věstník č. 7/99**)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/14184**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/06852**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/52
C 12 N	15/53
C 12 N	15/11
C 12 N	15/82
C 12 N	9/02
C 12 N	9/88
C 12 N	5/10
A 01 H	5/00

(71) Přihlášovatel:

UNIVERSITY OF HAWAII, Honolulu, HI, US;

(72) Původce:

Stiles John I., Kaneohe, HI, US;

Moisyadi Istefo, Honolulu, HI, US;

Neupane Kabi Raj, Honolulu, HI, US;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Čištění proteinů, sekvence rekombinantní DNA a způsoby řízení zrání kávovníkových rostlin

(57) Anotace:

Čištění proteinů, DNA sekvence, které kódují na jejich expresi a rekombinantní DNA molekuly, včetně hostitelů jimi transformovaných pro transformaci kávovníků k potlačení exprese enzymů nutných pro syntézu ethylenů. DNA sekvence s rekombinantní DNA molekuly jsou vyznačené tím, že kódují expresi pro enzymy ACC synthasy nebo ACC oxidasy, které jsou prvky linie biosyntézy ethylenů v kávovnících. Kávovníky jsou transformovány vektory obsahujícími ACC synthasové a/nebo ACC oxidasové DNA sekvence, které kódují expresi na příslušnou mRNA, která je antimediatorová k mRNA pro ACC synthasu a/nebo ACC oxidasu. Výsledná antimediatorová mRNA se váže k příslušné ACC synthasové nebo ACC oxidasové mRNA, čímž se inaktivuje mRNA kódující jeden nebo více enzymů v linii syntézy ethylenů. Popsané DNA sekvence mohou být také použity k blokování syntézy ACC synthasy nebo ACC oxidasy pomocí kósuprese. Výsledek je v každém případě takový, že transformované rostliny nejsou schop-

ny syntetizovat ethylen, ačkoli jiné aspekty jejich metabolismu nejsou ovlivněny.

CZ 450-99 A3

Čištěné proteiny, sekvence rekombinantní DNA a způsoby řízení zrání kávovníkových rostlin

Oblast techniky

Tato přihláška se týká čištěných proteinů, sekvencí rekombinantní DNA, jimi transformovaných hostitelů a způsobů řízení zrání kávovníkových rostlin. Zejména se tato přihláška vynálezu týká čištěných proteinů a sekvencí rekombinantní DNA, které mohou být použity k potlačení exprese pro kávovníkové plody specifické l-aminocyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC) syntasových a ACC oxidasových genů. Tato přihláška vynálezu se dále týká kávovníkových rostlin transformovaných takovými sekvencemi, čímž se učiní nezpůsobilými syntetizovat ethylen nutný pro zrání. Aplikace exogenního ethylenu do rostlin transformovaných podle tohoto vynálezu umožňuje synchronizovat a řídit zrání plodů kávovníkových rostlin.

Dosavadní stav techniky

Káva se připravuje z pražených zrn z rostlin rodu *Coffea*, hlavně z druhů *C. arabica*. Zrna jsou semena kávovníku a získávají se zpracováním plodu nejideálněji zralého plodu, který si zaslouží nejlepší cenu vlivem jeho výborné kvality. V minulosti vysoce kvalitní (gurmánská) káva byla sklížena ručně. To je nutné, poněvadž plody kávovníkového stromku nezrají stejnoměrně a tak jsou tam jak zralé, tak nezralé plody na stejném stromku. V minulosti to nebyl vážný problém, protože většina kávovníků se pěstovala v oblastech světa, kde je hojnost pracovní síly a ta není drahá. Avšak v současnosti ztráta hojné a laciné pracovní síly se stala hlavním přispěvatelem k snížené produktivitě při produkci kávy.

K zvýšení produktivity některé oblasti světa jako je největší produkční země Brazílie, se uchýlily k úplnému sklizení, kde pracovníci rychle odstraní všechny plody z větve, ať jsou zralé nebo nezralé. To zvyšuje rychlost sklizně, ale snižuje výtěžek zrn nejvyšší kvality podle toho, jak je plod nezralý (zelený).

Navíc nedostatek rovnoměrného zrání značně omezil účinnost mechanického sklizení. Síla vyžadovaná pro odstranění zralých plodů (červených) ze stromu je podobná síle požadované k odstranění zelených plodů. Tak mechanické sklízeče nerozlišují dobře mezi zelenými a červenými plody a velké množství nezralých plodů se sklízí spolu se zralými plody. To značně snižuje výtěžek zralých plodů a omezuje produktivitu. Kdyby zrání kávovníkových plodů mohlo být řízeno tak, aby všechny plody zrály najednou, jak česací způsob ručního sklizení, tak mechanické sklizení by mohlo být účinnější a vyšší procentáž sklizených plodů by byla ve vyšší kvalitativní třídě. To by zvýšilo výnosnost produkce kávy.

Jako v případě u mnoha jiných plodů [Yang a Hoffman, Ann.Rev.Plant Physiol.35:155 (1984)], rostlinou produkováný ethylen hraje důležitou roli v konečných stádiích zrání plodů u kávovníku. Jak kávovníkový plod dosáhne určitého stadia zralosti, může být indukováno zrání exogenní aplikací ethyleny [Crisosto, C.H., P.C. Tausend, M.A. Nagao, L.H. Fuchigami a T.H.H. Chen, J. Haw. Pac. Agri.3:13-17 (1991)]. To demonstruje důležitost ethyleny pro konečná stadia zrání plodů u kávy.

Ethylen se syntetizuje ve dvoustupňové reakci z S-adenosilmethioninu (SAM). První stupeň je syntéza 1-amino-cyklopropan-1-karboxylové kyseliny (ACC) z SAM pomocí ACC synthasy. U většiny rostlin je to rychlost omezující stupeň. Konečný stupeň je konverze ACC na ethylen, který se katalyzuje ACC oxidasou (Yang a Hoffman viz výše).

Inhibice biosyntézy ethylenu chemickými (například stříbrnými ionty nebo oxidem uhličitým) nebo biotechnologickými prostředky [Oeller a j., Science 254:437 (1991)] inhibuje konečné stupně zrání. Tato inhibice je reversibilní aplikací ethylenu.

Tudíž strategie pro řízení zrání kávovníkových rostlin je zabránit syntéze specifických enzymů na linii biosyntézy ethylenu. V jednom provedení tohoto vynálezu se to týká genetické změny kávovníkových rostlin, aby se eliminovaly syntéza ACC synthasy, v dalším se potlačí syntéza ACC oxidasy. V současně preferovaných provedeních se syntéza jednoho nebo obou těchto enzymů potlačí transformací kávovníkových rostlin DNA sekvencí, která kóduje na transkripci pro mediátorových RNA (mRNA), která je antimediatorová k mRNA, která kóduje na expresi pro enzym, jehož syntéza má být potlačena. Viz Oeller a j., Science 254: 437, 1991, kde se uvádí řízení zrání rajčat za použití podobné strategie.

Technologie rekombinantní DNA byla použita k izolaci určitého počtu ACC synthasových a ACC oxidasových genů. Avšak geny pro ACC synthasu a ACC oxidasu u kávovníku nebyly dosud identifikovány nebo sekvencovány.

Podstata vynálezu

Vynález se týká čištěných proteinů, sekvencí DNA, které kódují na expresi jejich a rekombinantních DNA molekul, včetně hostitelů jimi transformovaných pro transformaci kávovníkových rostlin pro potlačení exprese enzymů nutných pro syntézu ethylenu. Sekvence DNA a molekuly rekombinantní DNA jsou vyznačeny tím, že kódují na expresi pro enzymy ACC synthasy nebo ACC oxidasy, které jsou elementy linie pro biosyntézu ethylenu u kávovníkových rostlin.

Kávovníkové rostliny jsou transformovány vektory obsahujícími ACC synthasu a/nebo ACC oxidasovými DNA sekvencemi zařazenými tak, aby transformující sekvence kódovaly na expresi pro příslušnou antimediatorovou RNA vůči mRNA pro ACC synthasu a/nebo ACC oxidasu. Výsledná antimediatorová RNA se váže k mRNA, čímž se inaktivuje mRNA zakódování jednoho nebo více enzymů v linii pro syntézu ethylenu. Popsané DNA sekvence mohou být také použity k blokování syntézy ACC synthasy nebo ACC oxidasy za použití kosuprese. Výsledek v každém případě je takový, že transformované rostliny jsou neschopné syntetizovat ethylen, ačkoli jiné aspekty jejich metabolismu nejsou ovlivněny.

Zrání transformovaných rostlin může být regulováno exogenním ethylenem. Aplikací ethylenu do celé rostliny, celá rostlina bude zrát najednou, což dělá mechanické sklizení kávy produktivnějším.

Stručný popis výkresů

- Obr. 1 je úplná sekvence cDNA kódující kávovníkový plod expresovaný ACC synthasou,
- obr. 2 je aminokyselinová sekvence ACC synthasy kávovníkového plodu odvozené od cDNA sekvence znázorněné v obr. 1,
- obr. 3 je sekvence cDNA kódující kávovníkový plod expresovaný ACC oxidasou,
- obr. 4 je aminokyselinová sekvence ACC oxidasy kávovníkového plodu vyvozené z cDNA sekvence znázorněné v obr. 3.

Podrobný popis vynálezu

Aby zde popsaný vynález mohl být plně pochopen, je dále uveden detailní jeho popis. Při tomto popisu se používají následující výrazy.

Nukleotid - monomerní jednotka DNA nebo RNA sestávající z cukerné části (pentosy), fosfátu dusíkaté heterocyklické báze. Tato báze je vázána k cukerné části pomocí glykosidického uhlíku (1' uhlíku pentosy) a tato kombinace báze a cukru se nazývá nukleosid. Báze charakterizuje nukleotid. Čtyři DNA báze jsou adenin ("A"), guanin ("G"), cytosin ("C") a thymin ("T"). Čtyři RNA báze jsou A, G, C a uracil ("U").

DNA sekvence - lineární uspořádání nukleotidů spojených jednoho s druhým fosfodiesterovými vazbami mezi 3' a 5' uhlíky přilehlých pentos.

Kodon - DNA sekvence tří nukleotidů (triplet), která kóduje skrz mRNA aminokyselinu, translační startovací signále nebo translační terminační signál. Například nukleotidové triplety TTA, TTG, CTT, CTC, CTA a CTG kódují aminokyselinu leucin ("Leu"), TAG, TAA a TGA jsou translační koncové signály a ATG je translační startovací signál, který také kóduje aminokyselinu methionin (MET).

Polypeptid - lineární uspořádání aminokyselin připojených jedna k druhé peptidovými vazbami mezi aminoskupinami a karboxyskupinami přilehlých aminokyselin.

Genom - celá DNA buňky nebo viru. Zahrnuje mimo jiné strukturální genové kódování polypeptidů látky stejně jako promotor, transkripční a translační iniciační a terminační místa.

Gen - DNA sekvence, která kóduje skrze její matici nebo mediátorovou RNA ("mRNA") sekvenci aminokyselin charakteristickou pro specifický polypeptid.

Transkripce - způsob tvorby mRNA z genu nebo DNA sekvence.

Translace - způsob tvorby polypeptidu z mRNA.

Expese - způsob podstoupený genem nebo DNA sekvencí k produkci polypeptidu. Je to kombinace transkripce a translace.

Plasmid - nechromosomální dvouřetězcová DNA sekvence zahrnující intaktní "replikon", takže plasmid je replikován v hostitelské buňce. Když je plasmid uložen v jednobuněčném organizmu, vlastnosti tohoto organismu mohou být měněny nebo transformovány jako výsledek DNA tohoto plasmidu. Například plasmid nesoucí gen pro tetracyklinovou resistenci (TETR) transformuje buňku dříve citlivou na tetracyklin na buňku, která je vůči němu rezistentní. Buňka transformovaná plasmidem se nazývá "transformant".

Fág nebo bakteriofág - bakteriální viry, z nichž mnoho sestává z DNA sekvencí zapouzdřených v proteinovém obalu nebo povlaku ("kapsy").

Klonovací přenašeč (vektor) - plasmid, fágová DNA, kosmid nebo jiná DNA sekvence, která se schopná replikovat v hostitelské buňce, vyznačená jedním nebo malým počtem endonukleasových rozpoznávacích míst, ve kterých takovéto DNA sekvence mohou být přerušeny v určité podobě bez doprovodné ztráty základní biologické funkce DNA, například replikace produkce obalových proteinů nebo ztráty promotorových nebo vazebních míst a které obsahují signální znak vhodný pro použití při identifikaci transformovaných buněk, například tetracyklinovou nebo ampicilínovou resistenci. Klonovací přenašeč je často nazýván vektorem.

Klonování - způsob získávání populace organismů nebo DNA sekvencí odvozených z takovéhoho organismu nebo sekvence asexuální reprodukci.

Molekula rekombinantní DNA nebo hybrid DNA - molekula sestávající ze segmentů DNA z různých genomů, které byly spojeny konec ke konci venku z žijících buněk a schopných udržování v žijících buňkách.

cDNA - DNA řetězec komplementární k mRNA, který kóduje příslušný polypeptid.

Strategie pro řízení ethylenové biosyntézy u kávovníkových rostlin podle předloženého vynálezu se týká v první řadě určení genů, které kódují expresi dvou enzymů v ethylenové linii: ACC synthasy a ACC oxidasy. Transformace planého typu kávovníkových rostlin s konstrukty obsahujícími buď jeden nebo oba geny v orientaci, že jsou antimediátorové vůči normálním genům je očekávána k blokaci syntézy příslušných enzymů. Mediátorová RNA transkribovaná ve směru od transformující sekvence se bude vázat k mRNA transkribované ve směru od normální sekvence, čímž se inaktivuje normální posílání a zabráňuje se syntéze enzymu.

K izolaci DNA sekvencí, které kódují expresi ACC synthasy a ACC oxidasy u kávovníku původci prověřili cDNA banku vytvořenou z tkáně kávovníkové rostliny při syntetických DNA zkouškách obsahujících nukleotidové sekvence, které jsou předpokládány. Tyto očekávané sekvence byly založeny na studiích nukleotidových sekvencí, které se vyskytují v genech, které kódují příslušné enzymy jiných přechodných rostlin a jiných rostlin.

V tomto vynálezu cDNA odpovídající genu kódujícímu ACC synthasu nebo ACC oxidasu se použije k transformování embryonálních kávovníkových rostlin. Plasmid pBI-121 se použije jako transformační vektor. Sekvence odpovídající DNA, která kóduje expresi ACC synthasy nebo ACC oxidasy se zavedou do plasmidu v invertní orientaci přilehle k promotoru kvěťákového mozaikového viru 35S.

RNA z toho transkribovaná bude komplementární k mRNA, která kóduje aminokyselinovou sekvenci příslušného enzymu.

Kompletní konstrukty jsou amplifikovány v bakteriálních hostitelích. Hostitelé jsou rozrušeni a amplifikovaný vektor je připojen k částicím koloidního zlata. Částice zlata s adherentními vektory se zavedou do tkáně kávovníkové rostliny vháněním částic vysokou rychlostí do buněk jak je popsáno v US patentu 5 107 065. Mladé rostliny úspěšně transformované jsou identifikovány antibiotickou rezistencí. Transformované rostliny neprodukují ACC synthasu nebo ACC oxidasu v závislosti na genu použitém k transformaci rostlin. Zrání transformovaných rostlin je iniciováno aplikací exogenního ethylenu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Izolace pro kávovníkové plody specifické ACC synthasní cDNA

Aby se izolovaly ACC synthasní genové sekvence zapojené do zrání kávy, byla připravena cDNA banka ze směsi perikarpové a mezokarpové tkáně plodů kávy v různých stádiích zralosti. Tato banka byla tříděna pomocí PCR produktu syntetizovaného z prvořetězčové cDNA připravené ze stejné mRNA použité ke konstrukci banky a degeneraci oligonukleotidových primerů odpovídajících souhlasným sekvencím odvozeným z ACC synthasních genů z jiných organismů. Tento příklad v základu zahrnuje izolaci mRNA, konstrukci cDNA banky a následující kroky zahrnuté v klonování příslušné cDNA.

a) Izolace mRNA

Celková RNA byla izolována z 66 g perikarpové a mezokarpové tkáně z několika různých vývojových stavů plodů kávovníku (*C.arabica* L. cv. Guatemalan) pomocí metody Leviho a j., [Hort Science 27(12):1316-1318 (1992)]. Zmrazená kávová perikarpová a mezokarpová tkáň byla upráškována drcením po dobu asi 2 minut v domácím kávovém mlýnku (Salton Model GC-5, Salton Maxam Housewares Group, MT Prospect, IL) s malými kousky suchého ledu. Upráškováná plodová tkáň byla přidána do 200 mikrolitrů 200mM tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridu (tris-HCl) (pH 8,5), 1,5%ního dodecylsulfátu sodného (SDS), 300 mM LiCl, 10 mM disodné soli ethylendiamintetraoctové kyseliny (Na_2EDTA), 1,5 % deoxycholatu sodného (hm:obj), 1,5 % Nonidet P-40 (Sigma Chemical Company) (obj:obj), 0,5 mM thio-močoviny, 1 mM aurintrikarboxylové kyseliny, 10 mM dithio-threitolu (DTT), 75 mM B-merkptoethanolu, 2 % polyvinylpyrrolidonu (PVP) a 2 % polyvinylpolypyrrolidinu (PVVP) a byla provedena homogenizace pomocí Polytron tkáňového homogenizátoru (Tekmar, Cincinnati, OH).

Po 2 minutách homogenizace bylo přidáno 200 l chloroformu a homogenizace pokračovala po dobu dalších 3 minut. Homogenát byl převeden do 250 mikrolitrových odstředivkových lahviček (Nalgene) a centrifugován po dobu 15 minut při 2500.g. Vrchní vodná fáze byla odstraněna a smíchána s 12 mikrolitry 5M NaCl stejnoměrně rozdělena do 2 odstředivkových lahviček a bylo přidáno do každé lahvičky 150 mikrolitrů ethanolu. Směs byla uskladněna při 20 °C přes noc.

RNA byla shromážděna odstředěním při 4000.g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. RNA byla rozpuštěna v 50 mikrolitrech TEL (50 mM tris-HCl (pH 8,0), 10 mM Na₂EDTA) a vyčiřena odstřeďováním při 12 000.g po dobu 10 minut při 4 °C.

Supernatant byl převeden do nové odstředivkové lahvičky a byly přidány 3 mikrolitry 5 M NaCl a 30 mikrolitrů isopropanolu. Obsahy byly smíchány a uloženy při 20 °C přes noc. RNA byla shromážděna odstředěním při 14 000.g po dobu 10 minut. RNA byla promyta 20 mikrolitry 70%ního ledově studeného ethanolu a shromážděna odstředěním jako dříve. Po vysušení za vakua po dobu 10 minut byla RNA resuspendována v 50 mikrolitrech TEL pufu a bylo přidáno 10 mikrolitrů 12M LiCl.

Roztok byl inkubován při 4 °C po dobu 48 hodin a RNA byla shromážděna odstředěním při 14 000.g po dobu 10 minut a resuspendována ve 30 mikrolitrech TEL pufu. Po přidavku 15 mikrolitrů 5M octanu draselného byla RNA inkubována přes noc při 0 °C, získána odstředěním při 14 000.g po dobu 10 minut a suspendována v 50 mikrolitrech TEL pufu. Byly přidány 3 mikrolitry 5M NaCl a 110 mikrolitrů 95%ního ethanolu a RNA byla inkubována při -20 °C přes noc.

RNA byla získána odstředěním při 14 000.g po dobu 10 minut, promyta 20 mikrolitry 70%ního ledově studeného ethanolu, získána odstředěním jak je výše uvedeno, vysušena za

vakua během 10 minut a resuspendována v 600 mikrolitrech TEL pufru. RNA byla převedena do mikroodstředivkové zkumavky a odstředěna při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 30 minut při 4 °C po čemž bylo 300 mikrolitrů odebráno do každé ze 2 nových mikroodstředivkových zkumavek.

Původní odstředěná zkumavka byla propláchnuta dalšími 300 mikrolitry TEL pufru. Bylo přidáno 18 mikrolitrů 5M NaCl a 636 mikrolitrů 100%ního ethanolu do každé z těchto tří zkumavek. Po smíchání převrácením byly zkumavky uloženy přes noc při -20 °C. RNA byla shromážděna odstředěním při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 30 minut a promyta 1 mikrolitrem 70%ního ledově studeného ethanolu. Po odstředění a vysušení jako výše, byla RNA resuspendována ve 400 mikrolitrech sterilní H₂O. Celkem bylo získáno 1,04 úplné RNA.

Mediátorová RNA (polyA+ RNA) byla izolována za použití PolyAtract[®] mRNA Isolation System IV (Promega Corporation, Madison, WI).

Celkem byly provedeny dvě izolace následujícím způsobem. Pro každou izolaci bylo 0,4 mg úplné RNA rozpuštěno v 800 mikrolitrech RNase-prosté vody. Po zahřívání při 65 °C po dobu 10 minut byly přidány 3 mikrolitry 50 pmol/ml biotinylovaného oligo(dT) a 20,7 mikrolitrů 20 X SSC (1 X SSC obsahuje 150 mM NaCl a 15 mM citranu sodného) a směs byla ponechána pomalu chladnout na teplotu místnosti po dobu asi 30 minut.

Alikvot streptavidinových paramagnetických částic vytvořených v PolyAtract[®] mRNA Isolation System IV) byl promyt třikrát v 0,5 X SSC a resuspendován v 0,1 ml 0,5 X SSC. RNA roztok obsahující biotinylovaný oligo (dT) byl přidán k promytým streptavidinovým paramagnetickým částicím. Po 10 minutách inkubace při teplotě místnosti byly paramagnetické částice obsahující zachycenou mRNA shrnuty ke straně zkumavky pomocí magnetu.

Supernatant byl odstraněn a částice byly promyty čtyřikrát 0,3 ml 0,1 X SSC. mRNA byla odstraněna z biotinylovaných oligo(dT)částic suspendováním v 200 mikrolitrech RNase-prosté vody.

Další eluce byla provedena přidáním 150 mikrolitrů vody postupně do každé ze dvou zkumavek. Eluční frakce (550 mikrolitrů) byly sdruženy a odstředěny při 14 000 otáčkách za minutu v mikroadstředivce po dobu 30 minut při 4 °C. Supernatant byl rozdělen do dvou mikroadstředivkových zkumavek a po přidavku 0,1 objemu 3M NaCl a 600 mikrolitrů ethanolu byla mRNA získána inkubací zkumavek při -20 °C přes noc, načež následovalo odstředění jak bylo výše uvedeno.

mRNA byla promyta jednou 1 ml ledově studeného 70%ního ethanolu, vysušena a resuspendována ve 20 mikrolitrech sterilní vody. 1 mikrolitr byl přidán do 1 ml vody a bylo získáno spektrum od 230 nm do 330 nm v Shimadzu UV 160U spektrofotometru. Bylo získáno 6 mikrogramů mRNA z 1,04 mg celkové RNA.

b) Konstrukce cDNA banky

První a druhý řetězec cDNA byl syntetizován za použití ZAP-cDNA syntézního souboru (Strategene, La Jolla, CA). 6 mikroorganismů mRNA ve 20 mikrolitrech vody bylo inkubováno při 65 °C po dobu 5 minut. 2 mikrolitry 100mM methylrtuti byly přidány a inkubace pokračovala při teplotě místnosti po dobu 10 minut. Byly přidány 4 mikrolitry 700mM β-merkapt ethanolu a inkubace pokračovala po dalších 5 minut. Do denaturované mRNA bylo přidáno 5 mikrolitrů 10 X prvořetězcového pufru (zajištěného v souboru), 5 mikrolitrů 100mM DTT, 3 mikrolitry nukleotidové směsi (10 mM každého dATP, dGTP, dTTP a 5-methyl-dCTP), 2 mikrolitry 1,4 mikrogram/mikrolitr spojovacího primeru: 5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

(sekv.id.č.1),

1 mikrolitr RNase bloku a 5 mikrolitrů vody. Reakce byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 10 minut k teplotní hybridizaci primeru k mRNA a pak byly přidány 3 mikrolitry 20 j/mikrolitr M-MuLV reversní transkriptasy.

5 mikrolitrů této reakční směsi bylo odebráno do zkumavky obsahující 0,5 mikrolitrů (0,625 pmol) 800 Ci/mmol [α ³²P] dATP. Obě reakce byly inkubovány při 37 °C po dobu 1 hodiny. Radioaktivně značená reakce byla zmrazena při -20 °C pro pozdější gelovou analýzu.

Do 45 mikrolitrů hlavní reakce bylo přidáno 40 ml druhořetězcového pufru, 15 mikrolitrů 100mM DTT, 6 mikrolitrů nukleotidové směsi (10 mM dATP, dGTP, dTTP a 26 mM dCTP), 268,3 mikrolitry vody a 2 mikrolitry (2,5 pmol) 800 Ci/mmol [α ³²P] dATP. Po smíchání bylo přidáno 4,5 mikrolitrů 1 j/mikrolitr RNase H a 19,2 mikrolitrů 5,2 j/mikrolitr E. coli DNA polymerasy I a reakce byla inkubována při 16 °C po dobu 2,5 hodin. Reakce byla extrahována 400 mikrolitry fenol:chloroform (1:1). Fáze byly odděleny odstředěním v mikroadstředivce během 5 minut a vodná fáze odebrána a reextrahována chloroformem. Vodná fáze byla získána odstředěním jak bylo dříve uvedeno.

Dvouřetězcová cDNA byla vysrážena přidavkem 33,3 mikrolitrů 3M octanu sodného (pH 5,2) a 867 mikrolitrů 100% ethanolu a inkubací přes noc při -20 °C. cDNA byla získána odstředěním při 14 000 . g v mikroadstředivce při 4 °C po dobu 60 minut. cDNA byla promyta 1 ml 80%ního ethanolu, získána odstředěním při teplotě místnosti v odstředivce při 14 000 . g, vysušena za vakua a rozpuštěna ve 45 mikrolitrech vody. 3 mikrolitry resuspendované dvojřetězcové cDNA byly odebrány a uskladněny při -20 °C pro pozdější analýzu gelovou elektroforézou.

Do zbývajících 42 ml dvojřetězcové cDNA bylo přidáno 5 mikrolitrů 10 X Klenow pufru (pufr č. 3, dodávaný firmou Stratagene), 2,5 mikrolitrů 2,5 mM nukleotidů (dCTP, dGTP, dATP a dTTP) a 0,5 mikrolitrů 5 j/mikrolitr E. coli DNA polymerasy I Klenow fragmentu. Po 30 minutách při 37 °C bylo přidáno 50 mikrolitrů vody a reakce byla extrahována stejným objemem fenol:chloroform (1:1) a pak chloroformem jak bylo popsáno výše.

Po přidavku 7 mikrolitrů 3M octanu sodného (pH 5,2) a 226 mikrolitrů 100%ního ethanolu byla zarovnaně zakončena dvojřetězcová cDNA inkubována na ledu po dobu 30 minut a získána odstředěním při 14 000 otáčkách za minutu při 4 °C během 60 minut v mikroadstředivce. cDNA byla promyta 30 mikrolitry 70%ního ethanolu, odstředěna a vysušena jako dříve. Bylo přidáno 7 mikrolitrů 0,4 mikrogram/mikrolitr E_{co}RI spojovníků k vysušené cDNA. Struktury E_{co}RI spojovníků jsou:

5'-AATTCGGCACGAG-3' (sekv.id.č.2)

3'-GCCGTGCTC-5'.

Po zviření k resuspendaci cDNA byl přidán 1 mikrolitr 10 X ligačního pufru, 1 mikrolitr 10 mM ATP a 1 mikrolitr 4 Weiss j/mikrolitr T4 DNA ligasy a reakce byla inkubována přes noc při 8 °C. Ligasa byla inaktivována zahříváním při 70 °C po dobu 30 minut. 5' konce EcoRI spojovníků, které jsou nyní připojeny k cDNA, byly fosforylovány pomocí polynukleotidové kinasy. Byl přidán 1 mikrolitr 10 X pufru č. 3 ZAP-cDNA syntézního souboru (Stratagene, La Jolla, CA), 2 mikrolitry 10 mM ATP, 6 mikrolitrů vody a 1 mikrolitr 10 j/mikrolitr T4 polynukleotidové kinasy do ligačního roztoku.

Po 30 minutách při 37 °C byla reakce kinasy zastavena zahříváním reakce při 70 °C po dobu 30 minut. Byly vytvořeny XhoI "lepivé konce" na konci cDNA odpovídajícímu 3'konci

mRNA digescí XhoI místa ve spojovníku-primeru. 28 mikrolitrů XhoI pufru a 3 mikrolitrů 40 j/mikrolitr XhoI bylo přidáno do cDNA a reakce byla inkubována při 37 °C po dobu 1,5 hodin.

cDNA s EcoRI lepicími konci na 5' konci a XhoI lepicími konci na 3' konci (ve vztahu k původní mRNA) byl rozměrně frakcionován průchodem skrz Sephacryl S-400 otáčivý sloupec připravený následovně: 5 mikrolitrů 10 X STE [100 mM Tris (pH 7,0), 5 mM EDTA a 100 mM NaCl] bylo přidáno do cDNA a cDNA byla nanášena na vrchol 1 mililitrové injekční stříkačky obsahující Sephacryl S-400 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

500 mikrolitrová mikroodstředivková zkumavka byla umístěna na spodku injekční stříkačky a sloupec byl umístěn v odstředivkové zkumavce a odstředěn při asi 400.g po dobu 2 minut. Bylo přidáno 60 mikrolitrů 1 X STE do vrcholu stříkačky, nová mikroodstředivková zkumavka byla uložena na spodek sloupce a sloupec byl znovu odstředěn jako dříve.

Tento postup byl opakován až bylo shromážděno 6 frakcí. Asi 10 % z každé frakce byla elektroforezováno na 1% agarosovém gelu k určení rozdělení velikostí cDNA v každé frakci. Zbytek každé frakce byl extrahován stejným množstvím fenol/chloroform a pak chloroformem jak je popsáno výše a vysrážen přídatkem 2 objemů 100%ního ethanolu. Po inkubaci přes noc při -20 °C byla cDNA získána odstředěním v mikroodstředivce při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 60 minut při 4 °C. Každá cDNA frakce byla promyta 200 nl 80%ního ethanolu a vysušena jak je uvedeno výše.

cDNA frakce 1 byla resuspendována ve 3 mikrolitrech sterilní vody a cDNA frakce 2 byla resuspendována v 10,5 mikrolitrech sterilní vody.

Jedna polovina mikrolitru každé ze dvou frakcí byla použita k určení kvantity DNA pomocí ethidiumbromidové plotnové detekční metody. Frakce 1 a 2 obsahující největší cDNA molekuly byly sloučeny. 12,5 l sloučených frakcí obsahovalo přibližně 100 ng cDNA. Tato frakce byla redukována na 2,5 mikrolitrů ve Speed-Vac a uskladněna na ledu. cDNA frakce 3 byla resuspendována v 10,5 mikrolitru sterilní vody a zachována při -20°C pro pozdější použití.

0,01 ng cDNA z frakce 1 a 2 byla vázána do 1 mikrogramu Uni-ZAPTM (Stratagene, La Jolla, CA), lambda ZAP vektoru, který byl digerován s EcoEI a XhoI. Frakce 1 a 2 cDNA (2,5 mikrolitru) byly přidány do 0,5 mikrolitru 10 X ligačního pufru, 0,5 mikrolitru 10 mM ATP, 1 mikrolitr 1 mikrogram/mikrolitr Uni-ZAP XR vektoru a 0,5 mikrolitru 4Weiss j/mikrolitr T4 DNA ligasy.

Reakce byla inkubována při 8°C po dobu asi 44 h. 1 mikrolitr alikvotu ligační reakce byl přidán do 1 alikvotu "mrazicího-rozmrazovacího" extraktu z Gigapack II Gold bakteriofágové lambda balicí soupravy (Stratagene, La Jolla, CA). 15 mikrolitrů Sonic extraktu bylo přidáno a obsah byl jemně smíchán. Nabalení bylo prováděno při teplotě místnosti. Po 2 hodinách bylo přidáno 500 mikrolitrů SM pufru a 20 mikrolitrů chloroformu do každé nabalovací reakce a odpad byl odstraněn krátkým odstředěním v mikroadstředivce. Nabalené fágy byly převedeny do nové mikroadstředivkové zkumavky. Bylo přidáno 10 mikrolitrů chloroformu a nabalené fágy byly uskladněny při 4°C až do použití. Titr této primární banky indikoval přítomnost $0,7 \cdot 10^6$ rekombinantního plaku.

c) Amplifikace primární banky

600 mikrolitrů E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, CA) vypěstovaných na hustotu 0,5 při O.D.₆₀₀,

a 32,5 mikrolitru primárního bankovního zásobního roztoku bylo přidáno do každé ze 16 zkumavek. Po inkubaci při 37 °C po dobu 15 minut bylo přidáno 6,0 ml 48°C agaru (5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/l kvasnicového extraktu, 10 g/l NZ aminu (pH 7,5) a 0,7 % agarosy bylo přidáno do každé zkumavky a obsah byl potažen na 150 · 15 mm NZY plotny (5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄ · 7 H₂O, 5 g/l kvasnicového extraktu, 10 g/l NZ aminu (pH 7,5) a 15 g/l Difco agaru). Plotny byly inkubovány přes noc při 37 °C a pak překryty 10 ml SM pufru a inkubovány po dalších 8 hodin při 4 °C za jemného třepání. SM pufr byl sebrán sterilní pipetou a uskladněn v sterilní 250 mililitrové odstředivkové lahvi.

Každá plotna byla omyta dalšími 10 ml SM pufru, který byl sebrán a přidán k předcházejícími SM pufru. Byl přidán chloroform do konečné koncentrace 5 % a fágový roztok byl inkubován při teplotě místnosti po dobu 15 minut a pak odstředěn při 2000 · g po dobu 10 minut o odstranění buněčného odpadu. Supernatant byl získán do sterilní polypropylenové lahve a byl přidán chloroform do finální koncentrace 0,3 %. Amplifikovaná banka byla uložena při 4 °C.

d) Povlékání amplifikované banky pro třídění na specifické geny

Amplifikovaná banka byla titrována jak je popsáno výše. Přibližně 50 000 rekombinantního plaku bylo přidáno do 600 mikrolitrů E.coli XLI-Blue MRF', který byl vypěstován jak je popsáno výše. Po 15 minutách při 37 °C bylo přidáno 6,5 ml 48 °C teplého vrchního agaru a buňky byly naneseny na 150.15 mm NZY plotny. 4 plotny obsahující celkem 200 000 rekombinantních plaků byly připraveny a inkubovány při 37 °C přes noc. Tyto plotny pak byly chlazeny po dobu 4 hodin při 4 °C, pak byly použity pro přípravu plakových výtahů jak je popsáno dále.

e) Identifikace a konstrukce oligonukleotidů homologních k kávovníkovým ACC synthasovým genům

V předcházejících studiích popsanych v US patentové přihlášce pořadového čísla 08/485107, jejíž popis je zde začle-
něn formou odkazu, původci identifikovali základní sekvence
běžné k ACC synthase vyskytující se v různých rostlinách,
které se zde označují jako souhlasné sekvence. Na základě těch-
to studií původci vyvinuli sestavu tří plně degenerovaných
primerů pro PCR amplifikaci oblastí kávovníkové prvořetězcové
cDNA odpovídajících souhlasným sekvencím. Sekvence použitých
primerů je:

ACS167: 5'-GCCAAGCTTCRTGRTARTCYTGRAA-3'
(sekv.id.č.3)

ACS289: 5'-TTYCATRGAYTAYCAYGGHYT-3'
(sekv.id.č.4)

ACS885: 5'-CCHGGDARNCCYAWRTCTTT-3'
(sekv.id.č.5)

f) Reversní transkriptasová reakce k získání prvořetězcové kávovníkové cDNA

Reversní transkriptasová reakce k získání prvořetěz-
cové cDNA byla provedena v konečném objemu 20 mikrolitrů za
použití GeneAmp RNA PCR Core Kit (Perkin Elmer, Foster City,
CA). Nejdříve bylo smícháno 0,9 mikrogramů mRNA kávovníkového
plodu ve 3 mikrolitrech vody s 1 mikrolitrem 50 mikrom
nahodilého hexameru a 6 mikrolitry sterilní vody v mikroodstředivko-
vé zkumavce a inkubováno při 65 °C po dobu 5 minut.

Směs byla ponechána při teplotě místnosti po dobu
2 minut a kapalina byla získána u dna zkumavky krátkým odstře-
děním. Do této směsi byly přidány 2 mikrolitry PCR pufru II

(z výše zmíněného kitu), 4 mikrolitry 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP, 1 mikrolitr RNAsin (20 j/mikrolitr) a 10 mikrolitrů reversní transkriptasy (50 j/mikrolitr). Reakce byla inkubována při 42 °C po dobu 1 hodiny, načež byla reversní transkriptasa tepelní inaktivována v 95 °C vodní lázni po dobu 5 minut.

g) Reakce polymerasového řetězce k amplifikaci kávovníkového ACC-synthasního genu

Reakce polymerasního řetězce (PCR) (Saiki a j., 1988) byla provedena za použití GeneAmp Kitu popsaného výše v 50 mikrolitrové reakci obsahující 10 mikrolitrů prvořetězcové cDNA směsi, 4 mikrolitry PCR pufru II, 1 mikrolitr 25 mM MgCl₂, 2,5 mikrolitru 20 mikrom AC 5167 primeru (sekv.id.č.3) 2,5 mikrolitru 20 mikrom AC 5885 primeru (sekv.id.č.5), 29,5 mikrolitru sterilní vody a 0,5 mikrolitru Tag DNA polymerasy (5 g/mikrolitr). PCR podmínky byly 35 cyklů 94 °C po dobu 1 minuty, 44 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 2 minut.

Porodukt PCR reakce byl analyzován agarosogelovou elektroforézou za použití 1,5%ní SeaPlaque agarosy (FMC Bio Products, Rockland, ME) a Hae III digerované øX174 DNA (Promega Corporation, Madison, WI) jako markerů velikosti. Byl získán 1 PCR produkt o velikosti přibližně 650 párů bází.

h) Amplifikace PCR produktu s různými primery

650 bp fragment získaný výše byl excisován z gelu a uložen do 1,5 ml mikroodstředivkové zkumavky. Po přidavku 200 mikrolitrů sterilní vody byl 650 bp fragment zahříván na 90 °C po dobu 5 minut, ochlazen na teplotu místnosti a odstředěn při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut v mikroodstředivce. Supernatant obsahující amplifikovanou DNA byl odstraněn a uložen do nové sterilní 1,5 ml mikroodstředivkové zkumavky.

25 mikrolitrová PCR reakce byla provedena za použití 0,4 mikrolitrů dříve amplifikované DNA jako matrice, 2,5 mikrolitrů 10 X PCR pufu (10 mikrom tris-HCl pH 9,0, 0,1 % triton X-100), 2 mikrolitry 25 mM MgCl₂, 5 mikrolitrů 1 mM dNTPs, 1 mikrolitr 20 mikrom ACS289 primeru (sekv.id.č.5), 1 mikrolitr 20 mikrom ACS885 primeru (tabulka 2), 12,8 mikrolitru H₂O a 0,3 mikrolitry Tag DNA polymerasy (5 j/mikrolitr) (Promega Corporation, Madison, WI).

PCR byla provedena pomocí 35 cyklů 94 °C po dobu 1 minuty, 45 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 2 minut. 5 mikrolitrů této reakce byla elektroforezováno v 1,5%ním agarosovém gelu, jak je výše popsáno. Byl získán jediný produkt přibližně 603 bp. Ke zbytku reakce bylo přidáno 80 mikrolitrů sterilní vody, 10 mikrolitrů 3M octanu sodného (pH 5,2), a 220 mikrolitrů 100%ního ethanolu. Po inkubaci při 20 °C přes noc byla odstředěním získána DNA při 4 °C po dobu 30 minut při 14 000 otáčkách za minutu. DNA byla promyta 400 mikrolitry ledově studeného 75%ního ethanolu a resuspendována ve 25 mikrolitrech sterilní vody. DNA koncentrace byla určena, že je 10 ng/mikrolitr pomocí ethidiumbromidové plotnové zkoušky.

i) Značení kávovému plodu specifické ACC syntasní DNA

Nahodilý základní zkušební vzorek byl připraven za použití PCR-vytvořené ACC syntasní DNA a Prime-a-Gene Kit (Promega Corporation, Madison, WI). 2,5 mikrolitru DNA (25 ng) bylo přidáno do 27,5 mikrolitru sterilní vody a DNA byla denaturována vařením po dobu 5 minut. 10 mikrolitrů 5 X značícího pufu, 2 mikrolitry neznačeného dNTP (20 mikromol každého, dCTP, dGTP, dTTP), 2 mikrolitry 1 mg/ml acetylované BSA, 1 mikrolitr 5 j/mikrolitr E.coli DNA polymerasového I Klenow fragmentu a 5 mikrolitrů (50 mikromol) [α -³²P] dATP (3000 Ci/mmol) (Dupont-NEN) bylo přidáno, čímž se získal konečný objem 50 mikrolitrů.

Po 1 hodině při teplotě místnosti byla reakce terminována přidavkem 2 mikrolitrů 0,5 M Na₂ EDTA a vařena po dobu 2 min.

j) Třídění amplifikované banky ACC syntasně specifickou zkouškou

Byly připraveny platkové lify čtyř 150.15 mm NZY ploten, obsahující každý 50 000 rekombinantních klonů. Čtyři 132 mm Magna nylonové transferové membrány (Micron Separations, Incorporate, Westborough, MA) byly smočeny jejich uložením na chromatografický papír nasycený 5 X SSC pufrem na přibližně 10 sekund. Tyto membrány byly uloženy na plotny obsahující rekombinantní plak po dobu 5 minut, odstraněny a inkubovány, fágy obsahující horní strana byla po dobu 2 minut sycena na chromatografickém papíru 0,5 M NaOH a 1,5 M NaCl. Membrány pak byly neutralizovány převedením na chromatografický papír, nasycený 0,5 M tris-HCl (pH 8,0) a 1,5 M NaCl, po dobu 5 minut. Po krátkém 20 sekundovém zpracování na chromatografických listech nasycených 2 X SSC, které obsahovaly 0,2 M tris-HCl (pH 7,5), byly filtry vysáty do sucha. Po 1 hodině sušení na vzduchu byla DNA zesítna do membrán zpracováním pomocí 12 000 mikroJoulů 260 nm UV záření v UV Stratlinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA).

4 membrány byly předhybridizovány při 65 °C po dobu 2 hodin ve 100 ml 6 X SSPE (52,2 g/l NaCl, 8,3 g/l NaH₂PO₄⁻.H₂O, 2,2 g/l Na₂EDTA, (pH 7,4)), 5 X Denhardtova roztoku (1 g/l Ficoll, 1 g/l polyvinylpyrrolidonu, 1 g/l BSA (pentaxová frakce V)), 0,5%ní SDS a 100 mg/ml nasycené sledové spermatové DNA v Hybaid Mark II hybridizační sušárně (National Labnet Company, Wood Bridge, NJ) za použití HB-OV-BL lahví.

Hybridizace byla prováděna při 65 °C po dobu 12 hodin v 10 ml 6 X SSPE obsahujícím 0,5 % SDS 100 mikrog/ml denaturované sledové spermatové DNA a 52 mikrol nahodile primovaného vzorku popsaného výše.

Na konci hybridizační periody byl hybridizační roztok odstraněn a membrány byly rychle promyty 100 ml 2 X SSC obsahujícího 0,5 % SDS při 65 °C. Pak byly promyty po dobu dalších 30 min. stejným množstvím čerstvého pufru znovu při 65 °C. Membrány byly promyty ještě 2x po dobu 30 minut při 65 °C 100 ml 0,2 X SSC obsahujícího 0,5 % SDS, zabaleny do celofánového obalu a vystaveny předexponovanému Fuji RX_{GCU} rentgenovému filmu při -70 °C po dobu 24 hodin. Bylo získáno 10 pozitivních klonů.

Oblast původních ploten odpovídající identifikovanému plaku byla odstraněna a uložena v 1 ml SM pufru obsahujícího 20 mikrol chloroformu. Z těchto 10 bylo 5 znovu uloženo na plotny v nízkých hustotách a roztríděno jak je výše uvedeno k získání jednotlivého tlaku.

k) Charakterizace kávoových ACC syntasních cDNA klonů

Velikost předpokládaných kávoových ACC syntasních cDNA klonů byla určena polymerasní řetězcovou reakcí pomocí primerů homologních k části T3 a T7 promotorů přítomných v klonovacím vektoru a lemováním cDNA inserčního místa. Sekvence primerů jsou:

T3: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (sekv. id. č. 6)

T7: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3' (sekv. id. č. 7).

Podmínky pro PCR byly takové jaké jsou popsány výše s výjimkou, že teplotní cyklus byl 95 °C po dobu 1 minuty, 50 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 2 minut. Analýza byla provedena agarosovou gelovou elektroforézou jako dříve.

Tři nejrozsáhlejší klony byly získány jako famegidy excisí in vivo. 200 mikrolitrů fágového zásobního roztoku z 1 plaku bylo smícháno s 200 mikrolitry E. coli XL1-blue MRF' vypěstovanými do hustoty O.D.₆₀₀ 1,0. Byl přidán 1 mikrolitr ExAssist (Stratagene, La Jolla, CA) pomocného fágu (> 1 X 10⁶ pfu/mikrol) a zkumavky byly inkubovány při 37 °C po dobu 15 minut.

Byly přidány 3 ml sterilního LB bujónu a byly inkubovány po dobu 3 hodin při 37 °C za třepání. Po zahřívání při 70 °C po dobu 20 minut a odstředění při 1000.g po dobu 15 minut byl 1 ml supernatantu obsahujícího excisované pBluescriptové fagemidy uložené jako vláknité fágové částice, byl převeden do sterilní 1,5 ml mikroodstředivkové zkumavky a uskladněn při 4 °C. Fagemidy byly získány přidávkem 25 ml zásobního roztočku do 200 mikrolitrů E.coli Solar buněk (Stratagene, La Jolla, CA) vypěstovaných do hustoty 1, když byly měřeny při O.D.600.

Po inkubaci při 37 °C po dobu 15 minut bylo 200 mikrolitrů buněčné směsi uloženo na 100.15 mm NZY agarových plotnách obsahujících 50 mikrog/ml ampicilinu. Plotny byly inkubovány přes noc při 37 °C. Jednotlivé kolonie byly sebrány do 10 ml LB bujónu obsahujícího 50 mikrog/ml ampicilinu a pěstovány přes noc při 37 °C v třepacím inkubátoru. Buňky byly koncentrovány v 1,5 ml sterilní mikroodstředivkové zkumavce opakovaným odstředěním a plasmid DNA byl vyčištěn za použití plasmidové minisoupravy od QIAGEN.

Bakteriální pelety byly promyty vodou a resuspendovány v 0,3 ml pufru P1. Pak bylo přidáno 0,3 ml alkalického lýzního pufru P2 jemně smícháno a inkubováno po méně než 5 minut při teplotě místnosti. Pak následoval přídavek 0,3 ml studeného pufru P3 a míchání obracením zkumavek 6 x, extrakty byly inkubovány na ledu po dobu 10 minut a odstředěny při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 15 minut v mikroodstředivce. Supernatanty byly odstraněny a aplikovány do QIAGEN-tyt 20 sloupců, které byly předem vyváženy 1 mm QDT pufru.

Extrakty byly ponechány vstoupit do pryskyřice sloupců gravitačním tokem. Jakmile proud ustal, sloupce byly promyty 4x 1 ml pufru QC. DNA byly eluovány promytím QIAGEN-tyt 20 sloupci s 0,8 ml pufru QF, který byl jímán do 0,5 ml mikroodstředivkových zkumavek.

DNA byla vysrážena přidavkem 0,7 objemů (560 mikrolitrů) isopropanolu. Zkumavky byly ihned odstředěny při 14 000 otáčkách za minutu po dobu 30 minut a supernatant byl pečlivě odebrán. Pelety obsahující DNA byly promyty 20x 1 ml ledově studeného 70%ního ethanolu, odstředěny jak je výše uvedeno a vysušeny na vzduchu po dobu 5 minut. DNA byly resuspendovány v 50 mikrolitrech sterilní vody. Koncentrace DNA z jedné plasmidové izolace byla 0,1 mikrog/mikrol fluorometrickou analýzou.

Sekvenční reakce byly provedeny smísením 8 mikrol fagmidu DNA (0,8 mikrog) se 4 mikrol buď T3 nebo T7 sekvenčních primerů (0,8 pmol/mikrol). Automatizované DNA sekvencování bylo provedeno u těchto vzorků v University of Hawaii, Biotechnology Service Center.

Bylo získáno asi 350 párů bází sekvence z jak 5', tak 3' konce cDNA. Nové sekvenční primery byly syntetizovány na základě sekvencí u konce předcházejících sekvencí a použity stejným způsobem ke kompletaci sekvence obou řetězců cDNA. Úplná sekvence kávové expresované ACC synthasní cDNA je uvedena v obr. 1. Odvozená aminokyselinová sekvence kávové expresované ACC synthasy je uvedena v obr. 2.

Sekvence kávového ACC synthasního cDNA klonu a odvozeného proteinu byla porovnána s jinými ACC synthasními geny uloženými v GenBank. cDNA izolovaná z kávovníkového plodu vykazala 68,3%ní až 58,1%ní identitu s jinými ACC synthasami přítomnými v GenBank. A proteinová sekvence odvozená z této cDNA vykazuje 67,9%ní až 50,5%ní identitu vůči jiným ACC synthasám. Avšak tato cDNA je unikátní v tom, že žádné jiné sekvence větší než 1500 párů bází nevykazovaly větší než 68,3%ní identitu s ní.

Příklad 2

Izolace kávovníkovému specifické ACC oxidasy

a) Syntéza ACC oxidasových specifických oligonukleotidových primerů

Izolace úplné RNA, mRNA a syntéza kávovníkovému plodu specifické cDNA byla popsána výše.

12 ACC oxidasových sekvencí získaných z GenBank bylo seřazeno za použití Pileup programu GCG (Genetics Computer Group, Madison, WI). Oblast přibližně 1000 párů bází z translačního startovacího kodónu byla zjištěna, že má být konzervována a byl syntetizován degenerační oligonukleotidový primer

5'-TCATIGCKKCRAKIGGTTC-3' (sekv. id. č. 8)
odpovídající této oblasti.

Inosin (I) byl uložen v pozicích nevykazujících sekvenční konzervaci, protože tato pozice by mohla být jakýkoli A, T, G nebo C. Pozice vykazující dvojitou nejednoznačnost byly připraveny se smíchanými zbytky (T/G nebo A/G).

Původci také připravili druhý primer homologní k oblasti papajové expresované ACC oxidasové cDNA, která byla dříve klonována v laboratoři původců a situována přibližně s 372 páry bází od translačního startovacího kodónu:

5'-GACACTGTGGAGAGGCTGAC-3' (sekv. id. č. 9).

Tyto dva primery byly použity v PCR reakci k amplifikaci části kávovníkovým plodem expresované ACC oxidasy. PCR obsahovala 0,2 mikrolitry (10 ng) cDNA frakce 3 (popsáno v příkladu 1), 5 mikrolitrů 10 X PCR pufru, 3 mikrolitry 25 mM MgCl₂, 1 mikrolitr každého ze 4 10mM dNTPs, 1 mikrolitr 20 mM roztoku každého primeru, 0,3 mikrolitry Taq DNA polymerasy (Promega Corporation, Madison, WI) a 38,5 mikrolitrů vody.

PCR podmínky byly 35 cyklů při 94 °C po dobu 1 minuty, 50 °C po dobu 1 minuty a 72 °C po dobu 1 minuty. 5minutová inkubace při 72 °C byla provedena po posledním cyklu. 20 mikrolitrů alikvotu produktu bylo elektroforezováno v 1,5%ním agarosovém gelu jak bylo dříve popsáno a vykázalo přibližně 800 párů bází produktu. DNA byla excisována z gelu a smíchána s 200 mikrolitry sterilní vody v 1,5 ml mikroodstředivkové zkumavce. Po zahřívání po dobu 5 minut byly 2 mikrolitry použity jako matrice v 50 mikrolitrech PCR reakce jako výše za použití těchto primerů. Gelová elektroforéza jak byla výše popsána za použití 20 mikrolitrů PCR reakce indikovala přítomnost jediného produktu o 800 párů bází.

Do zbývajících 30 mikrolitrů PCR reakce bylo přidáno 20 mikrolitrů chloroformu a 100 mikrolitrů vody. Obsah byl smíchán a odstředován po dobu 2 minut při 14 000 otáčkách za minutu v mikroodstředivce. Vrchní vodná fáze obsahující DNA byla odstraněna do čisté mikroodstředivkové zkumavky. Část této DNA byla radioaktivně značena při nahodilé primerové syntéze jak bylo výše popsáno.

b) Třídění amplifikované banky nahodile přiravenou nukleotidovou sondou

Amplifikovaná cDNA kávového plodu popsána v příkladu 1 byla použita k přípravě 4 150.10 mm NZY ploten jak bylo dříve popsáno. Předhybridizace, hybridizace a získávání klonů byly prováděny jak bylo dříve popsáno s výjimkou, že ACC oxidasová sekvence získaná PCR byla použita jako nukleotidová sonda.

c) Charakterizace kávových ACC oxidasových cDNA klonů

Velikost kávových ACC oxidasových cDNA klonů byla určena polymerasovou řetězcovou reakcí za použití primerů homologních k T3 a T7 promotorů jak je popsáno v příkladu 1.

Sekvence největšího kávového ACC oxidasového cDNA klonu byla získána tak, jak je popsáno v příkladu 1 a srovnána s ACC oxidasovými geny přítomnými v GenBank. Obr. 3 uvádí sekvenci kávové specifické ACC oxidasy. Obr. 4 uvádí předpokládanou aminokyselinovou sekvenci tohoto proteinu. cDNA byla určena ke kódování ACC oxidasy, poněvadž je od 50,4 % do 82,5 % identická jako jiné ACC syntasové nukleokyselinové sekvence přítomné v GenBank. Také předpokládaná proteinová sekvence je od 32,5 % do 86,5 % identická s jinými ACC oxidasami.

Předcházející příklady provedení jsou určeny pouze pro ilustrativní účely a neměly by být nahlíženy jako omezení rozsahu předloženého vynálezu, který je shrnut v připojených patentových nárocích.

Obr. 1: Odvozená aminokyselinová sekvence ACC synthasy z
Coffea arabica (sekv. id. č. 10)

Met Glu Phe Ser Leu Lys Asn Glu Gln Gln Gln Leu Leu Ser Lys
1 5 10 15

Met Ala Thr Asn Asp Gly His Gly Glu Asn Ser Pro Tyr Phe Asp Gly
20 25 30

Trp Lys Ala Tyr Asp Ser Asp Pro Tyr His Pro Thr Arg Asn Pro Asn
35 40 45

Gly Val Ile Gln Met Gly Leu Ala Glu Asn Gln Leu Cys Phe Asp Leu
50 55 60

Ile Glu Glu Trp Val Leu Asn Asn Pro Glu Ala Ser Ile Cys Thr Ala
65 70 75

Glu Gly Ala Asn Lys Phe Met Glu Val Ala Ile Tyr Gln Asp Tyr His
80 85 90 95

Gly Leu Pro Glu Phe Arg Asn Ala Val Ala Arg Phe Met Glu Lys Val
100 105 110

Arg Gly Asp Arg Val Lys Phe Asp Pro Asn Arg Ile Val Met Ser Gly
115 120 125

Gly Ala Thr Gly Ala His Glu Thr Leu Ala Phe Cys Leu Ala Asp Pro
130 135 140

Glu Asp Ala Phe Leu Val Pro Thr Pro Tyr Tyr Pro Gly Phe Asp Arg
145 150 155

Asp Leu Arg Trp Arg Thr Gly Met Gln Leu Leu Pro Ile Val Cys Arg
160 165 170 175

Ser Ser Asn Asp Phe Lys Val Thr Lys Glu Ser Met Glu Ala Ala Tyr
180 185 190

Gln Lys Ala Gln Glu Ala Asn Ile Arg Val Lys Gly Phe Leu Leu Asn
195 200 205

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

Asp Ile Val Thr Phe Ile Asn Asp Lys Asn Ile His Leu Ile Cys Asp
225 230 235

Glu Ile Tyr Ser Ala Thr Val Phe Ser Gln Pro Glu Phe Ile Ser Ile
240 245 250 255

Ser Glu Ile Ile Glu His Asp Val Gln Cys Asn Arg Asp Leu Ile His
260 265 270

Leu Val Tyr Ser Leu Ser Lys Asp Leu Gly Phe Pro Gly Phe Arg Val
275 280 285

Gly Ile Leu Tyr Ser Tyr Asn Asp Ala Val Val Ser Cys Ala Arg Lys
290 295 300

Met Ser Ser Phe Gly Leu Val Ser Thr Gln Thr Gln His Leu Ile Ala
305 310 315

Ser Met Leu Ser Asp Glu Ala Phe Met Asp Lys Ile Ile Ser Thr Ser
320 325 330 335

Ser Glu Arg Leu Ala Ala Arg His Gly Leu Phe Thr Arg Gly Leu Ala
340 345 350

Gln Val Gly Ile Gly Thr Leu Lys Ser Ser Ala Gly Leu Tyr Phe Trp
355 360 365

Met Asp Leu Arg Arg Leu Leu Arg Glu Ser Thr Phe Glu Ala Glu Met
370 375 380

Glu Leu Trp Arg Ile Ile Ile His Glu Val Lys Leu Asn Val Ser Pro
385 390 395

Gly Leu Ser Phe His Cys Ser Glu Pro Gly Trp Phe Arg Val Cys Phe
400 405 410 415

Ala Asn Met Asp Asp Glu Ser Val Arg Val Ala Leu Arg Arg Ile His
420 425 430

Lys Phe Val Leu Val Gln Gly Lys Ala Thr Glu Pro Thr Thr Pro Lys
435 440 445

Ser Arg Cys Gly Ser Ser Lys Leu Gln Leu Ser Leu Ser Phe Arg Arg
450 455 460

Leu Asp Glu Arg Val Met Gly Ser His Met Met Ser Pro His Ser Pro
465 470 475

Met Ala Ser Pro Leu Val Arg Ala Thr
480 485

Obr. 2: Kávovníkovým plodem expresovaná ACC syntasová
sekvence (sekv. id. č. 11)

GTAATCTCTT CTAAAATCAA CCATTCTCTT CATTCTTCAC TTGACAAGGC CACTGCAITC	60
TTCATTCTTT CTGATATAT AGCCATTTTT TTCATTCTTT CTGATATAT AGCCATTTTT	120
TTCATTCTTT CTTCATTCAAT TGCTGGAGA AGTTGGTTGA GTTTTCTTGA AAATTCAAGC	180
AAAACA ATG GAG TTC AGT TTG AAA AAC GAA CAA CAA CAA CTC TTG TCG AAG	231
ATG GCA ACC AAC GAT GGA CAT GGC GAA AAC TCG CCT TAT TTT GAT GGT	279
TGG AAG GCA TAT GAT AGT GAT CCT TAC CAT CCC ACC AGA AAT CCT AAT	327
GGT GTT ATA CAG ATG GGA CTC GCA GAA AAT CAG TTA TGC TTT GAT TTG	375
ATC GAG GAA TGG GTT CTG AAC AAT CCA GAG GCT TCC ATT TGC ACA GCA	423
GAA GGA GCG AAC AAA TTC ATG GAA GTT GCT ATC TAT CAA GAT TAT CAT	471
GGC TTG CCA GAG TTC AGA AAT GCT GTA GCA AGG TTC ATG GAG AAG GTG	519
AGA GGT GAC AGA GTC AAG TTC GAT CCC AAC CGC ATT GTG ATG AGT GGT	567
GGG GCA ACC GGA GCT CAT GAA ACT CTG GCC TTC TGT TTA GCT GAC CCT	615
GAA GAT GCG TTT TTG GTA CCC ACA CCA TAT TAT CCA GGA TTT GAT CGG	663
GAT TTG AGG TGG CGA ACA GGG ATG CAA CTT CTT CCA AIT GTT TGT CGC	711
AGC TCC AAT GAT TTT AAG GTC ACT AAA GAA TCC ATG GAA GCT GCT TAT	759
CAG AAA GCT CAA GAA GCC AAC ATC AGA GTA AAG GGG TTC CTC TTA AAT	807

AAT CCA TCA AAT CCA TTG GGA ACT GTT CTT GAC AGG GAA ACT TTG ATT 855

GAT ATA GTC ACA TTC ATC AAT GAC AAA AAT ATC CAC TTG ATT TGT GAT 903

GAG ATA TAT TCT GCC ACC GTC TTC AGC CAG CCC GAA TTC ATC AGC ATC 951

TCT GAA ATA ATT GAG CAT GAT GTT CAA TGC AAC CGT GAT CTC ATA CAT 999

CIT GTG TAT AGC CTG TCC AAG GAC TTG GGC TTC CCT GGA TTC AGA GTT 1047

GGC ATT TTG TAT TCA TAT AAT GAC GCT GTT GTC AGC TGT GCT AGA AAA 1095

ATG TCG AGT TTC GGC CTT GTT TCA ACA CAA ACT CAG CAT CTG ATT GCA 1143

TCA ATG TTA TCG GAC GAA GCA TTT ATG GAC AAA ATC ATT TCC ACG AGC / 1191

TCA GAG AGA TTA GCT GCA AGG CAT GGT CTT TTC ACA AGA GGA CTT GCT 1239

CRA GTA GGC ATT GGC ACC TTA AAA AGC AGT GCG GGC CTT TAT TTC TGG 1287

ATG GAC TTA AGG AGA CTC CTC AGG GAG TCC ACA TTT GAG GCA GAA ATG 1335

GAA CTT TGG AGG ATC ATA ATA CAT GAA GTC AAG CTC AAT GTT TCA CCA 1383

GGC TTA TCT TTC CAT TGC TCA GAA CCA GGA TGG TTC AGA GTT TGC TTT 1431

GCC AAC ATG GAC GAC GAA AGT GTG AGA GTT GCT CTC AGA AGA ATC CAC 1479

AAA TTT GTG CTT GTT CAG GGC AAG GCA ACA GAG CCA ACA ACT CCA AAG 1527

AGT CGC TGC GGA AGC AGC AAA CTT CAA CTC AGC TTA TCT TTC CGC AGA 1575

TTG GAC GAA AGG GTG ATG GGA TCG CAT ATG ATG TCC CCT CAC TCC CCG 1623

ATG GCT TCA CCT TTG GTT CGG GCT ACA TAAATCATTI CITGATCAGA TCATATAGCA 1680

AAGATTCCTG AGTAAATACT CGAAACCCCTT TCTGGATAAC TGAAAAGAGA GTTGTTGATT 1740

CITTGCTGTA TCATACAAAC ACGTTACAGG CATTITTTGG CCATCTGATG CGTGCAAATT 1800

GCATCAAATG CTTTTATTAT TGTCATATTC ATTTGTGTAC CITGGTTTTTC CITGCCCTTC 1860

AGTCCTCCTT GTTTTTTGTT TCTTTGTTAT TATTTTCTTC CAGTTGATCA GTTAAACGAA 1920

GGAAGCTCAA TTGTTTCAAG CTATTAGTAA CAGATCAITT TGTAATAGCA ATAGTTTCAG 1980

GATTCGAAA TGAAAGTTTA TCATTTTTCC ATCATTTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2040

Pozn.: Kódovací část této sekvence je znázorněna seskupeními bází jako kodonů

Obr. 3: Dedukovaná proteinová sekvence kávovníkovým plodem
expresované ACC oxidasové cDNA (sekv. id. č. 12)

Met Ala Thr Phe
1

Pro Leu Ile Asp Met Glu Lys Leu Asp Gly Glu Glu Arg Ala Ala Thr
5 10 15 20

Met Gly Val Ile Lys Asp Ala Cys Glu Ser Trp Gly Phe Phe Glu Val
25 30 35

Leu Asn His Gly Ile Ser Asn Glu Leu Met Asp Thr Val Glu Arg Leu
40 45 50

Thr Lys Glu His Tyr Lys Lys Cys Met Glu Leu Lys Phe Lys Glu Met
55 60 65

Val Glu Ser Lys Glu Leu Glu Ala Val Gln Thr Glu Ile Asn Asp Leu
70 75 80

Asp Trp Glu Ser Thr Phe Phe Leu Arg His Leu Pro Val Ser Asn Ile
85 90 95 100

Ser Glu Val Pro Asp Leu Asp Asp Glu Tyr Arg Lys Val Met Lys Glu
105 110 115

Phe Ala Leu Gln Leu Glu Lys Leu Ala Glu Leu Leu Leu Asp Leu Leu
120 125 130

Cys Glu Asn Leu Gly Leu Glu Lys Gly Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Tyr
135 140 145

Gly Thr Lys Gly Pro Thr Phe Gly Thr Lys Val Ser Asn Tyr Pro Pro
150 155 160

Cys Pro Arg Pro Glu Leu Ile Lys Gly Leu Arg Ala His Thr Asp Ala
165 170 175 180

Gly Gly Ile Ile Leu Leu Phe Gln Asp Asp Lys Val Ser Gly Leu Gln
185 190 195

Leu Leu Lys Asp Gly Glu Trp Val Asp Val Pro Pro Met Arg His Ser
200 205 210

Ile Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Glu Val Ile Thr Asn Gly Lys
215 220 225

Tyr Lys Ser Val Met His Arg Val Ile Ala Gln Pro Asp Gly Asn Arg
230 235 240

Met Ser Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Pro Gly Ser Asp Ala Val Ile Tyr
245 250 255 260

Pro Ala Pro Ala Leu Val Glu Lys Glu Ala Glu Asp Lys Gln Ile Tyr
265 270 275

Pro Lys Phe Val Phe Glu Asp Tyr Met Lys Leu Tyr Ala Gly Leu Lys
280 285 290

Phe Gln Ala Lys Glu Pro Arg Phe Glu Ala Met Lys Ala Val Glu Ser
295 300 305

Thr Val Asn Leu Gly Pro Ile Ala Thr Val
310 315

Obr. 4: DNA sekvence v kávovníkovém plodu expresované ACC
oxidasové cDNA (sekv.id.č.13)

TGTAACGAA GCATAAGCAC AAGCAAACAC AAAC TAGAAA GAGAG ATG GCT ACA TTC 57

CCC CTA ATC GAC ATG GAG AAG CTT GAC GGT GAA GAG AGG GCT GCC ACT 105

ATG GGA GTC ATA AAA GAT GCT TGT GAA AGC TGG GGC TTC TTT GAG GTG 153

TTG AAT CAT GGG ATA TCT AAT GAG CTC ATG GAC ACA GTG GAG AGG CTA 201

ACA AAG GAG CAT TAC AAG AAA TGT ATG GAA CTA AAG TTC AAG GAA ATG 249

GTG GAG AGC AAG GAA TTG GAA GCT GTT CAG ACT GAG ATC AAT GAT TTG 297

GAC TGG GAA AGT ACC TTC TTC TTG CGC CAT CTT CCT GTT TCC AAC ATC 345

TCA GAA GTC CCT GAT CTT GAT GAT GAA TAC AGA AAG GTT ATG AAG GAA 393

TTT GCG TTG CAA CTT GAG AAA CTA GCA GAG CTC CTG TTG GAC TTG CTA 441

TGC GAG AAC CTT GGC CTA GAG AAA GGC TAT CTG AAG AAA GCC TTC TAT 489

GGC ACC AAA GGA CCA ACC TTT GGC ACC AAA GTC AGC AAT TAC CCT CCA 537

TGC CCT CGT CCA GAA CTG ATC AAG GGC CTC CGG GCA CAC ACC GAT GCC 585

GGC GGC ATC ATC CTG CTG TTC CAG GAT GAC AAG GTC AGC GGT CTC CAG 633

CTC CTC AAG GAT GGT GAA TGG GTG GAT GTT CCG CCT ATG CGC CAC TCC 681

ATT GTA ATC AAC ATC GGC GAC CAA CTT GAG GTA ATC ACA AAT GGA AAA 729

TAC AAG AGT GTG ATG CAC CGG GTG ATA GCT CAA CCA GAT GGG AAC AGA	777
ATG TCA CTA GCA TCA TTC TAC AAT CCA GGA AGT GAT GCA GTG ATC TAT	825
CCA GCA CCG GCA TTG GTT GAG AAA GAG GCA GAG GAC AAG CAG ATA TAT	873
CCC AAG TTT GTG TTC GAG GAC TAC ATG AAG CTC TAT GCT GGC CTT AAG	921
TTC CAA GCT AAA GAG CCC AGG TTT GAA GCC ATG AAG GCC GTG GAA AGC	969
ACC GTA AAC TTG GGT CCA ATC GCA ACT GTT TGAGATAATA CACGCTTTGA	1019
TCTGCTGCTG TCTTATAATG CGCGTTTGCG TAATCATATC CTAGCATAGT ATATCTGAGA	1079
TCTGAGTCTG TATTGTGGTG TGAGTTTGGT TTAGCCCCTT GTTAATGCTT GGATTGGACT	1139
AGTTAAATGT GGAGCTGGTT TGTTAGATAA GATAGTCTTG CCAGGATCTT TGAGTAAATA	1199
TGATTCTGCG GAAGTCTGCG GTGAATGATA ACGTGTAAG CAATCCGAAA GTTACCTTTC	1259
TGGGGCTTTG TCATATGCAA TGGAGAAGGA ATCTTCCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1319
A	1320

Pozn.: Kódovací část této sekvence je znázorněna seskupením
bází jako kodonů

Seznam sekvencí

(1) Obecná informace:

(i) Přihlašovatel: Stiles, John I.
Moisyady, Istefo
Nelupane, Kabi R.

(ii) Název vynálezu: Čištěné proteiny, rekombinantní DNA sekvence a způsoby řízení zrání kávy

(iii) Počet sekvencí: 13

(iv) Korespondenční adresa:

- (A) adresát: Jones, Day, Reavis and Pogue
- (B) ulice: North Point, 901, Lakeside Avenue
- (C) město: Cleveland
- (D) stát: Ohio
- (E) země: USA
- (F) ZIP: 44114

(v) Počítačově čitelná forma:

- (A) druh média: disketa, 3,5 inch, 1,44 Mb kapacita
- (B) počítač: IBM PC kompatibilní
- (C) operační systém: MS-DOS v. 5.1
- (D) software: Word Perfect v.6.1

(vi) Současné údaje přihlášky:

- (A) číslo přihlášky: 08/695 412
- (B) datum podání: 12. srpen 1996
- (C) třídění: 435

(vii) Prioritní údaje:

- (A) číslo přihlášky: US 08/485 107
- (B) datum podání: 7. červen 1995

(viii) Zástupce/zmocněnec-informace:

- (A) jméno: Griffith, Calvin P.
- (B) registrační číslo: 34 831
- (C) referenční/spisové číslo: 265036600002

(ix) Telekomunikační informace:

- (A) telefon: (216) 586-7050
- (B) telefax: (216) 579-0212

(2) Informace pro sekv. id. č. 1

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 15 aminokyselinových zbytků
- (B) typ: aminokyselina
- (C) řetězovitost: N/A
- (D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: peptid

(ix) Rys:

- (A) jméno/klíč: fragment A
- (B) lokace: 17..1480

(xi) Popis sekvence: sekv. id. č. 1:

Ile	Asn	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Leu	Asp	Gln	Xaa	Gly
1				5				10						15

(2) Informace pro sekv. id. č. 2:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 14 aminokyselinových zbytků
- (B) typ: aminokyselina
- (D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: peptid

(xi) Popis sekvence: sekv. id. č. 2:

Ile	Asn	Tyr	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Leu	Asp	Gln	Thr
1				5					10				14

(2) Informace pro sekv. id.č.3:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina

(C) řetězovitost: jednoduchá

(D) topologie: lineární

:(ii) Molekulový typ: jiná nukleová kyselina

(A) popis: primer

(v) Typ fragmentu: vnitřní

(ix) Rys:

(A) jiná informace: N je inosin

(xi) Popis sekvence: sekv. id. č. 3:

ATNAAYTAYG CNAGYGGNGC 20

(2) Informace pro sekv. id. č. 4:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina

(C) řetězovitost: jednoduchá

(D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: jiná nukleová kyselina
(A) Popis: primer

(v) Fragmentální typ: vnitřní

(ix) Rys
(A) jiná informace: N je inosin

(xi) Popis sekvence: sekv. id. č. 4:
ATNAAYTAYG CNAGYGGNGC 20

(2) Informace pro sekv. id. č. 5:

(i) Sekvenční charakteristiky:
(A) délka: 20 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězcovitost: jednoduchá
(D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: jiná nukleová kyselina
(A) popis: primer

(v) Fragmentální typ: vnitřní

(ix) Rys
(A) jiná informace: N je inosin

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 5:
CGNCCAGNCG NYTAYTTNAT 20

(2) Informace pro sekv. id. č. 6:

(i) Sekvenční charakteristiky:
(A) délka: 20 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězcovitost: jednoduchá
(D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: DNA (genomická)

(A) popis: primer

(v) Fragmentální typ: vnitřní

(ix) Rys

(A) jiná informace: N je inosin

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 6:

CGNCCYCTYG CYTAYTTNAT 20

(2) Informace pro sekv. id. č. 7:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 14 aminokyselinových zbytků

(B) typ: aminokyselina

(C) řetězcovitost: jednoduchá

(D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: peptid

(v) Fragmentální typ: vnitřní

(ix) Rys

(D) jiná informace: Xaa je buď Thr nebo Asp

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 7:

Gln	Tyr	Val	Pro	Cys	Tyr	Phe	Xaa	Phe	Ile	Asp	Asp	Gln	Asp
1				5					10				14

(2) Informace pro sekv. id. č. 8:

(i) Sekvenční charakteristiky:

(A) délka: 20 párů bází

(B) typ: nukleová kyselina

(C) řetězcovitost: jednoduchá

(D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: jiná nukleová kyselina
(A) popis: primer

(v) Fragmentální typ: vnitřní

(ix) Rys
(A) jiná informace: N je inosin

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 8:
CAWTATGTNC CNTGTTATTT 20

(2) Informace pro sekv. id. č. 9:

(i) Sekvenční charakteristiky:
(A) délka: 20 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězcovitost: jednoduchá
(D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: jiná nukleová kyselina
(A) popis: primer

(v) Fragmentální typ: vnitřní

(ix) Rys
(A) jiná informace: N je inosin

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 9:
AAWTAWCAHG GNACWTATTG 20

(2) Informace pro sekv. id. č. 10:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 488 aminokyselinových zbytků
- (B) typ: aminokyselina
- (C) řetězovitost: jednoduchá
- (D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: protein

(ix) Rys:

(A) název/klíč: CDS

(B) lokace: 178 .. 1653

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 10:

Met	Glu	Phe	Ser	Leu	Lys	Asn	Glu	Gln	Gln	Gln	Leu	Leu	Ser	Lys
1				5				10						15
Met	Ala	Thr	Asn	Asp	Gly	His	Gly	Glu	Asn	Ser	Pro	Tyr	Phe	Asp
				20				25						30
Gly	Trp	Lys	Ala	Tyr	Asp	Ser	Asp	Pro	Tyr	His	Pro	Thr	Arg	Asn
				35				40						45
Pro	Asn	Gly	Val	Ile	Gln	Met	Gly	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Leu	Cys
				50				55						60
Phe	Asp	Leu	Ile	Glu	Glu	Trp	Val	Leu	Asn	Asn	Pro	Glu	Ala	Ser
				65				70						75
Ile	Cys	Thr	Ala	Glu	Gly	Ala	Asn	Lys	Phe	Met	Glu	Val	Ala	Ile
				80				85						90
Tyr	Gln	Asp	Tyr	His	Gly	Leu	Pro	Glu	Phe	Arg	Asn	Ala	Val	Ala
				95				100						105
Arg	Phe	Met	Glu	Lys	Val	Arg	Gly	Asp	Arg	Val	Lys	Phe	Asp	Pro
				110				115						120
Asn	Arg	Ile	Val	Met	Ser	Gly	Gly	Ala	Thr	Gly	Ala	His	Glu	Thr
				125				130						135

Leu Ala Phe Cys Leu Ala Asp Pro Glu Asp Ala Phe Leu Val Pro
140 145 150

Thr Pro Tyr Tyr Pro Gly Phe Asp Arg Asp Leu Arg Trp Arg Thr
155 160 165

Gly Met Gln Leu Leu Pro Ile Val Cys Arg Ser Ser Asn Asp Phe
170 175 180

Lys Val Thr Lys Glu Ser Met Glu Ala Ala Tyr Gln Lys Ala Gln
185 190 195

Glu Ala Asn Ile Arg Val Lys Gly Phe Leu Leu Asn Asn Pro Ser
200 205 210

Asn Pro Leu Gly Thr Val Leu Asp Arg Glu Thr Leu Ile Asp Ile
215 220 225

Val Thr Phe Ile Asn Asp Lys Asn Ile His Leu Ile Cys Asp Glu
230 235 240

Ile Tyr Ser Ala Thr Val Phe Ser Gln Pro Glu Phe Ile Ser Ile
245 250 255

Ser Glu Ile Ile Glu His Asp Val Gln Cys Asn Arg Asp Leu Ile
260 265 270

His Leu Val Tyr Ser Leu Ser Lys Asp Leu Gly Phe Pro Gly Phe
275 280 285

Arg Val Gly Ile Leu Tyr Ser Tyr Asn Asp Ala Val Val Ser Cys
290 295 300

Ala Arg Lys Met Ser Ser Phe Gly Leu Val Ser Thr Gln Thr Gln
305 310 315

His Leu Ile Ala Ser Met Leu Ser Asp Glu Ala Phe Met Asp Lys
320 325 330

Ile Ile Ser Thr Ser Ser Glu Arg Leu Ala Ala Arg His Gly Leu
335 340 345

Phe Thr Arg Gly Leu Ala Gln Val Gly Ile Gly Thr Leu Lys Ser
350 355 360

Ser Ala Gly Leu Tyr Phe Trp Met Asp Leu Arg Arg Leu Leu Arg
365 370 375

Glu Ser Thr Phe Glu Ala Glu Met Glu Leu Trp Arg Ile Ile Ile
380 385 390

His Glu Val Lys Leu Asn Val Ser Pro Gly Leu Ser Phe His Cys
395 400 405

Ser Glu Pro Gly Trp Phe Arg Val Cys Phe Ala Asn Met Asp Asp
 410 415 420

Glu Ser Val Arg Val Ala Leu Arg Arg Ile His Lys Phe Val Leu
 425 430 435

Val Gln Gly Lys Ala Thr Glu Pro Thr Thr Pro Lys Ser Arg Cys
 440 445 450

Gly Ser Ser Lys Leu Gln Leu Ser Leu Ser Phe Arg Arg Leu Asp
 455 460 465

Glu Arg Val Met Gly Ser His Met Met Ser Pro His Ser Pro Met
 470 475 480

Ala Ser Pro Leu Val Arg Ala Thr
 485

(2) Informace pro sekv. id. č. 11:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 2040 párů bází
- (B) typ: nukleová kyselina
- (C) řetězcovitost: jednoduchá
- (D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: cDNA k mRNA

(ix) Rys:

- (A) název/klíč: CDS
- (B) lokace: 178 .. 1653

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 11:

GTAATCTCTT CTAAAATCAA CCATTCTCTT CATTCTTCAC TTGACAAGGC 50

CACTGCATTC TTCATTCTTT CTTGATATAT AGCCATTTTT TTCATTCTTT 100

CTTGATATAT AGCCATTTTT TTCATTCTTT CTCATTCAT TGTCTGGAGA 150

AGTTGGTTGA GTTTTCTTGA AAATCAAGC AAAACA ATG GAG TTC AGT 198
 Met Glu Phe Ser
 1

TTG AAA AAC GAA CAA CAA CAA CTC TTG TCG AAG ATG GCA ACC 240
 Leu Lys Asn Glu Gln Gln Gln Leu Leu Ser Lys Met Ala Thr
 5 10 15

AAC GAT GGA CAT GGC GAA AAC TCG CCT TAT TTT GAT GGT TGG	282
Asn Asp Gly His Gly Glu Asn Ser Pro Tyr Phe Asp Gly Trp	
20 25 30	
AAG GCA TAT GAT AGT GAT CCT TAC CAT CCC ACC AGA AAT CCT	324
Lys Ala Tyr Asp Ser Asp Pro Tyr His Pro Thr Arg Asn Pro	
35 40 45	
AAT GGT GTT ATA CAG ATG GGA CTC GCA GAA AAT CAG TTA TGC	366
Asn Gly Val Ile Gln Met Gly Leu Ala Glu Asn Gln Leu Cys	
50 55 60	
TTT GAT TTG ATC GAG GAA TGG GTT CTG AAC AAT CCA GAG GCT	408
Phe Asp Leu Ile Glu Glu Trp Val Leu Asn Asn Pro Glu Ala	
65 70	
TCC ATT TGC ACA GCA GAA GGA GCG AAC AAA TTC ATG GAA GTT	450
Ser Ile Cys Thr Ala Glu Gly Ala Asn Lys Phe Met Glu Val	
75 80 85	
GCT ATC TAT CAA GAT TAT CAT GGC TTG CCA GAG TTC AGA AAT	492
Ala Ile Tyr Gln Asp Tyr His Gly Leu Pro Glu Phe Arg Asn	
90 95 100	
GCT GTA GCA AGG TTC ATG GAG AAG GTG AGA GGT GAC AGA GTC	534
Ala Val Ala Arg Phe Met Glu Lys Val Arg Gly Asp Arg Val	
105 110 115	
AAG TTC GAT CCC AAC CGC ATT GTG ATG AGT GGT GGG GCA ACC	576
Lys Phe Asp Pro Asn Arg Ile Val Met Ser Gly Gly Ala Thr	
120 125 130	
GGA GCT CAT GAA ACT CTG GCC TTC TGT TTA GCT GAC CCT GAA	618
Gly Ala His Glu Thr Leu Ala Phe Cys Leu Ala Asp Pro Glu	
135 140	
GAT GCG TTT TTG GTA CCC ACA CCA TAT TAT CCA GGA TTT GAT	660
Asp Ala Phe Leu Val Pro Thr Pro Tyr Tyr Pro Gly Phe Asp	
145 150 155	
CGG GAT TTG AGG TGG CGA ACA GGG ATG CAA CTT CTT CCA ATT	702
Arg Asp Leu Arg Trp Arg Thr Gly Met Gln Leu Leu Pro Ile	
160 165 170	

GTT	TGT	CGC	AGC	TCC	AAT	GAT	TTT	AAG	GTC	ACT	AAA	GAA	TCC	744
Val	Cys	Arg	Ser	Ser	Asn	Asp	Phe	Lys	Val	Thr	Lys	Glu	Ser	
		175					180					185		
ATG	GAA	GCT	GCT	TAT	CAG	AAA	GCT	CAA	GAA	GCC	AAC	ATC	AGA	786
Met	Glu	Ala	Ala	Tyr	Gln	Lys	Ala	Gln	Glu	Ala	Asn	Ile	Arg	
		190						195					200	
GTA	AAG	GGG	TTC	CTC	TTA	AAT	AAT	CCA	TCA	AAT	CCA	TTG	GGA	828
Val	Lys	Gly	Phe	Leu	Leu	Asn	Asn	Pro	Ser	Asn	Pro	Leu	Gly	
				205								210		
ACT	GTT	CTT	GAC	AGG	GAA	ACT	TTG	ATT	GAT	ATA	GTC	ACA	TTC	870
Thr	Val	Leu	Asp	Arg	Glu	Thr	Leu	Ile	Asp	Ile	Val	Thr	Phe	
215					220					225				
ATC	AAT	GAC	AAA	AAT	ATC	CAC	TTG	ATT	TGT	GAT	GAG	ATA	TAT	912
Ile	Asn	Asp	Lys	Asn	Ile	His	Leu	Ile	Cys	Asp	Glu	Ile	Tyr	
	230					235					240			
TCT	GCC	ACC	GTC	TTC	AGC	CAG	CCC	GAA	TTC	ATC	AGC	ATC	TCT	954
Ser	Ala	Thr	Val	Phe	Ser	Gln	Pro	Glu	Phe	Ile	Ser	Ile	Ser	
		245					250					255		
GAA	ATA	ATT	GAG	CAT	GAT	GTT	CAA	TGC	AAC	CGT	GAT	CTC	ATA	996
Glu	Ile	Ile	Glu	His	Asp	Val	Gln	Cys	Asn	Arg	Asp	Leu	Ile	
			260					265					270	
CAT	CTT	GTG	TAT	AGC	CTG	TCC	AAG	GAC	TTG	GGC	TTC	CCT	GGA	1038
His	Leu	Val	Tyr	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Leu	Gly	Phe	Pro	Gly	
				275					280					
TTC	AGA	GTT	GGC	ATT	TTG	TAT	TCA	TAT	AAT	GAC	GCT	GTT	GTC	1080
Phe	Arg	Val	Gly	Ile	Leu	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Asp	Ala	Val	Val	
285					290					295				
AGC	TGT	GCT	AGA	AAA	ATG	TCG	AGT	TTC	GGC	CTT	GTT	TCA	ACA	1122
Ser	Cys	Ala	Arg	Lys	Met	Ser	Ser	Phe	Gly	Leu	Val	Ser	Thr	
	300					305					310			
CAA	ACT	CAG	CAT	CTG	ATT	GCA	TCA	ATG	TTA	TCG	GAC	GAA	GCA	1164
Gln	Thr	Gln	His	Leu	Ile	Ala	Ser	Met	Leu	Ser	Asp	Glu	Ala	
		315					320					325		

TTT ATG GAC AAA ATC ATT TCC ACG AGC TCA GAG AGA TTA GCT	1206
Phe Met Asp Lys Ile Ile Ser Thr Ser Ser Glu Arg Leu Ala	
330 335 340	
GCA AGG CAT GGT CTT TTC ACA AGA GGA CTT GCT CAA GTA GGC	1248
Ala Arg His Gly Leu Phe Thr Arg Gly Leu Ala Gln Val Gly	
345 350	
ATT GGC ACC TTA AAA AGC AGT GCG GGC CTT TAT TTC TGG ATG	1290
Ile Gly Thr Leu Lys Ser Ser Ala Gly Leu Tyr Phe Trp Met	
355 360 365	
GAC TTA AGG AGA CTC CTC AGG GAG TCC ACA TTT GAG GCA GAA	1332
Asp Leu Arg Arg Leu Leu Arg Glu Ser Thr Phe Glu Ala Glu	
370 375 380	
ATG GAA CTT TGG AGG ATC ATA ATA CAT GAA GTC AAG CTC AAT	1374
Met Glu Leu Trp Arg Ile Ile Ile His Glu Val Lys Leu Asn	
385 390 395	
GTT TCA CCA GGC TTA TCT TTC CAT TGC TCA GAA CCA GGA TGG	1416
Val Ser Pro Gly Leu Ser Phe His Cys Ser Glu Pro Gly Trp	
400 405 410	
TTC AGA GTT TGC TTT GCC AAC ATG GAC GAC GAA AGT GTG AGA	1458
Phe Arg Val Cys Phe Ala Asn Met Asp Asp Glu Ser Val Arg	
415 420	
GTT GCT CTC AGA AGA ATC CAC AAA TTT GTG CTT GTT CAG GGC	1500
Val Ala Leu Arg Arg Ile His Lys Phe Val Leu Val Gln Gly	
425 430 435	
AAG GCA ACA GAG CCA ACA ACT CCA AAG AGT CGC TGC GGA AGC	1542
Lys Ala Thr Glu Pro Thr Thr Pro Lys Ser Arg Cys Gly Ser	
440 445 450	
AGC AAA CTT CAA CTC AGC TTA TCT TTC CGC AGA TTG GAC GAA	1584
Ser Lys Leu Gln Leu Ser Leu Ser Phe Arg Arg Leu Asp Glu	
455 460 465	
AGG GTG ATG GGA TCG CAT ATG ATG TCC CCT CAC TCC CCG ATG	1626
Arg Val Met Gly Ser His Met Met Ser Pro His Ser Pro Met	
470 475 480	

GCT TCA CCT TTG GTT CGG GCT ACA TAAATCATT CTTGATCAGA 1670
Ala Ser Pro Leu Val Arg Ala Thr
485

TCATATAGCA AAGATTCCTG AGTAAATACT CGAAACCCTT TCTGGATAAC 1720
TGAAAAGAGA GTTGTGATT CTTEGCTGTA TCATACAAAC ACGTTACAGG 1770
CATTTTTTGG CCATCTGATG CGTGCAAATT GCATCAAATG CTTTTATTAT 1820
TGTCATATTC ATTTGTGTAC CTTGGTTTTT CTTGCCCTTC AGTCCTCCTT 1870
GTTTTTTGTT TCTTTGTTAT TATTTTCTTC CAGTTGATCA GTTAAACGAA 1920
GGAAGCTCAA TTGTTTCAAG CTATTAGTAA CAGATCATT TGTAATAGCA 1970
ATAGTTTCAG GATTCTGAAA TGAAAGTTA TCATTTTTCC ATCATTTTAA 2020
AAAAAAAAA AAAAAAAAAA 2040

(2) Informace pro sekv. id. č. 12:

(i) Sekvenční charakteristiky:

- (A) délka: 318 aminokyselinových zbytků
- (B) typ: aminokyselina
- (C) řetězcovitost: jednoduchá
- (D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: protein

(ix) Typ:

- (A) název/klíč: CDS
- (B) lokace: 46..1003

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 12

Met	Ala	Thr	Phe	Pro	Leu	Ile	Asp	Met	Glu	Lys	Leu	Asp	Gly	Glu
1				5					10					15
Glu	Arg	Ala	Ala	Thr	Met	Gly	Val	Ile	Lys	Asp	Ala	Cys	Glu	Ser
				20					25					30
Trp	Gly	Phe	Phe	Glu	Val	Leu	Asn	His	Gly	Ile	Ser	Asn	Glu	Leu
				35					40					45
Met	Asp	Thr	Val	Glu	Arg	Leu	Thr	Lys	Glu	His	Tyr	Lys	Lys	Cys
				50					55					60

Met Glu Leu Lys Phe Lys Glu Met Val Glu Ser Lys Glu Leu Glu
65 70 75

Ala Val Gln Thr Glu Ile Asn Asp Leu Asp Trp Glu Ser Thr Phe
80 85 90

Phe Leu Arg His Leu Pro Val Ser Asn Ile Ser Glu Val Pro Asp
95 100 105

Leu Asp Asp Glu Tyr Arg Lys Val Met Lys Glu Phe Ala Leu Gln
110 115 120

Leu Glu Lys Leu Ala Glu Leu Leu Leu Asp Leu Leu Cys Glu Asn
125 130 135

Leu Gly Leu Glu Lys Gly Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Tyr Gly Thr
140 145 150

Lys Gly Pro Thr Phe Gly Thr Lys Val Ser Asn Tyr Pro Pro Cys
155 160 165

Pro Arg Pro Glu Leu Ile Lys Gly Leu Arg Ala His Thr Asp Ala
170 175 180

Gly Gly Ile Ile Leu Leu Phe Gln Asp Asp Lys Val Ser Gly Leu
185 190 195

Gln Leu Leu Lys Asp Gly Glu Trp Val Asp Val Pro Pro Met Arg
200 205 210

His Ser Ile Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Glu Val Ile Thr
215 220 225

Asn Gly Lys Tyr Lys Ser Val Met His Arg Val Ile Ala Gln Pro
230 235 240

Asp Gly Asn Arg Met Ser Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Pro Gly Ser
245 250 255

Asp Ala Val Ile Tyr Pro Ala Pro Ala Leu Val Glu Lys Glu Ala
260 265 270

Glu Asp Lys Gln Ile Tyr Pro Lys Phe Val Phe Glu Asp Tyr Met
275 280 285

Lys Leu Tyr Ala Gly Leu Lys Phe Gln Ala Lys Glu Pro Arg Phe
290 295 300

Glu Ala Met Lys Ala Val Glu Ser Thr Val Asn Leu Gly Pro Ile
305 310 315

Ala Thr Val
318

(2) Informace pro sekv. id. č. 13:

- (i) Sekvenční charakteristiky:
(A) délka: 1320 párů bází
(B) typ: nukleová kyselina
(C) řetězcovitost: jednoduchá
(D) topologie: lineární

(ii) Molekulový typ: cDNA k mRNA

(ix) Rys:

(A) název/klíč: CDS

(B) lokace: 46..1003

(xi) Sekvenční popis: sekv. id. č. 13:

TG	TAA	AC	GAA	GC	ATA	AG	CAC	AAG	CAA	AC	AA	CT	AG	AG	AT	G	48
																Met	
																1	
GCT	ACA	TTC	CCC	CTA	ATC	GAC	ATG	GAG	AAG	CTT	GAC	GGT	GAA				90
Ala	Thr	Phe	Pro	Leu	Ile	Asp	Met	Glu	Lys	Leu	Asp	Gly	Glu				
			5					10					15				
GAG	AGG	GCT	GCC	ACT	ATG	GGA	GTC	ATA	AAA	GAT	GCT	TGT	GAA				132
Glu	Arg	Ala	Ala	Thr	Met	Gly	Val	Ile	Lys	Asp	Ala	Cys	Glu				
				20					25								
AGC	TGG	GGC	TTC	TTT	GAG	GTG	TTG	AAT	CAT	GGG	ATA	TCT	AAT				174
Ser	Trp	Gly	Phe	Phe	Glu	Val	Leu	Asn	His	Gly	Ile	Ser	Asn				
30					35					40							
GAG	CTC	ATG	GAC	ACA	GTG	GAG	AGG	CTA	ACA	AAG	GAG	CAT	TAC				216
Glu	Leu	Met	Asp	Thr	Val	Glu	Arg	Leu	Thr	Lys	Glu	His	Tyr				
	45					50					55						
AAG	AAA	TGT	ATG	GAA	CTA	AAG	TTC	AAG	GAA	ATG	GTG	GAG	AGC				258
Lys	Lys	Cys	Met	Glu	Leu	Lys	Phe	Lys	Glu	Met	Val	Glu	Ser				
		60					65					70					
AAG	GAA	TTG	GAA	GCT	GTT	CAG	ACT	GAG	ATC	AAT	GAT	TTG	GAC				300
Lys	Glu	Leu	Glu	Ala	Val	Gln	Thr	Glu	Ile	Asn	Asp	Leu	Asp				
			75					80					85				

TGG GAA AGT ACC TTC TTC TTG CGC CAT CTT CCT GTT TCC AAC	342
Trp Glu Ser Thr Phe Phe Leu Arg His Leu Pro Val Ser Asn	
90 95	
ATC TCA GAA GTC CCT GAT CTT GAT GAT GAA TAC AGA AAG GTT	384
Ile Ser Glu Val Pro Asp Leu Asp Asp Glu Tyr Arg Lys Val	
100 105 110	
ATG AAG GAA TTT GCG TTG CAA CTT GAG AAA CTA GCA GAG CTC	426
Met Lys Glu Phe Ala Leu Gln Leu Glu Lys Leu Ala Glu Leu	
115 120 125	
CTG TTG GAC TTG CTA TGC GAG AAC CTT GGC CTA GAG AAA GGC	468
Leu Leu Asp Leu Leu Cys Glu Asn Leu Gly Leu Glu Lys Gly	
130 135 140	
TAT CTG AAG AAA GCC TTC TAT GGC ACC AAA GGA CCA ACC TTT	510
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Tyr Gly Thr Lys Gly Pro Thr Phe	
145 150 155	
GGC ACC AAA GTC AGC AAT TAC CCT CCA TGC CCT CGT CCA GAA	552
Gly Thr Lys Val Ser Asn Tyr Pro Pro Cys Pro Arg Pro Glu	
160 165	
CTG ATC AAG GGC CTC CGG GCA CAC ACC GAT GCC GGC GGC ATC	594
Leu Ile Lys Gly Leu Arg Ala His Thr Asp Ala Gly Gly Ile	
170 175 180	
ATC CTG CTG TTC CAG GAT GAC AAG GTC AGC GGT CTC CAG CTC	636
Ile Leu Leu Phe Gln Asp Asp Lys Val Ser Gly Leu Gln Leu	
185 190 195	
CTC AAG GAT GGT GAA TGG GTG GAT GTT CCG CCT ATG CGC CAC	678
Leu Lys Asp Gly Glu Trp Val Asp Val Pro Pro Met Arg His	
200 205 210	
TCC ATT GTA ATC AAC ATC GGC GAC CAA CTT GAG GTA ATC ACA	720
Ser Ile Val Ile Asn Ile Gly Asp Gln Leu Glu Val Ile Thr	
215 220 225	
AAT GGA AAA TAC AAG AGT GTG ATG CAC CGG GTG ATA GCT CAA	762
Asn Gly Lys Tyr Lys Ser Val Met His Arg Val Ile Ala Gln	
230 235	

CCA GAT GGG AAC AGA ATG TCA CTA GCA TCA TTC TAC AAT CCA	804
Pro Asp Gly Asn Arg Met Ser Leu Ala Ser Phe Tyr Asn Pro	
240 245 250	
GGA AGT GAT GCA GTG ATC TAT CCA GCA CCG GCA TTG GTT GAG	846
Gly Ser Asp Ala Val Ile Tyr Pro Ala Pro Ala Leu Val Glu	
255 260 265	
AAA GAG GCA GAG GAC AAG CAG ATA TAT CCC AAG TTT GTG TTC	888
Lys Glu Ala Glu Asp Lys Gln Ile Tyr Pro Lys Phe Val Phe	
270 275 280	
GAG GAC TAC ATG AAG CTC TAT GCT GGC CTT AAG TTC CAA GCT	930
Glu Asp Tyr Met Lys Leu Tyr Ala Gly Leu Lys Phe Gln Ala	
285 290 295	
AAA GAG CCC AGG TTT GAA GCC ATG AAG GCC GTG GAA AGC ACC	972
Lys Glu Pro Arg Phe Glu Ala Met Lys Ala Val Glu Ser Thr	
300 305	
GTA AAC TTG GGT CCA ATC GCA ACT GTT TGAGATAATA CACGCTTTGA	1019
Val Asn Leu Gly Pro Ile Ala Thr Val	
310 315	
TCTGCTGCTG TCTTATAATG CGCGTTTGCG TAATCATATC CTAGCATAGT	1069
ATATCTGAGA TCTGAGTCTG TATTGTGGTG TGAGTTTGGT TTAGCCCCTT	1119
GTTAATGCTT GGATTGGACT AGTTAAATGT GGAGCTGGTT TGTTAGATAA	1169
GATAGTCTTG CCAGGATCTT TGAGTAAATA TGATTCTGCG GAAGTCTGCG	1219
GTGAATGATA ACGTGTAAG CAATCCGAAA GTTACCTTTC TGGGGCTTTG	1269
TCATATGCAA TGGAGAAGGA ATCTTCCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1319
A	1320

Příklad A

a) Konstrukce vektorů pro expresi pozitivních ACC syntasových a ACC oxidasových transkriptů

ACC syntasové a ACC oxidasové cDNA mohou být použity k modifikaci obsahu ethylenu v kávě, například pozitivní expresí nebo kosupresí. Je popsán příklad tohoto použití s vektorem pKR1. Je to jen příklad a mnoho jiných rostlinných transformačních vektorů by mohlo být použito ve spojení s ACC syntasovými a ACC oxidasovými cDNA. pKR1 byl vytvořen modifikací pBI-121 (Clontech Laboratories) jak je dále uvedeno.

Dvě synthetické sekvence o 38 párech bází obsahujících lox rozpoznávacích míst pro cre místně specifickou rekombinasi byly inzertovány, aby obklopovaly neomycinofosfotransferasový II (NPT II) selektovatelný značkovací gen pBI-121. Tato lox místa umožňují odstranění NPT II genu z konstruktu po tom, co je začleněn do rostlinného genomu (Dale a Ow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10558 (1991)), ale nesouvisí s funkcí ACC syntasové a ACC oxidasové cDNA v pozitivním smyslu.

Tři syntetické oligonukleotidy byly syntetizovány na základě loxP sekvencí definovaných Dalem a Owem (viz výše). Sekvence těchto oligonukleotidů jsou:

loxA: 5'-AGCTATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT-3',

loxB: 5'-AGCTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT-3' a

loxC: 5'-ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATAGCT-3'.

loxB je komplementární řetězec jak k loxA tak k loxC. Když loxA a loxB byly tepelně hybridizovány, vytvořily dvojřetězcovou molekulu se 4bázovými přesahy komplementárními k HindIII přesahům, které umožňují inzerci dvojřetězcové sekvence do HindIII místa, takže se nalézají po NOS transkripční terminační sekvenci přilehlé k NPT II genu v pBI-121.

Teplotní hybridizace loxC s loxB vytváří zarovnaně zakončenou dvojřetězcovou DNA obsahující lox rozpoznávací místo.

Syntetická lox místa byla inzertována tak, že obklopují NPT II gen pBI-121 následovně: pBI-121 byl digеровán s PmeI (New England Biolabs, Beverly, MA) při 37 °C po dobu 2 hodin v reakčním pufru dodaném výrobcem. pBI-121 má jedno PmeI místo právě v blízkosti NOS promotoru, který řídí expresi NPT II genu. Syntetické lox místo bylo vytvořeno teplotní hybridizací ekvimolárních množství loxB a loxC zahříváním při 95 °C, pomalým ochlazením na teplotu místnosti a ligací do PmeI-digerovaného pBI-121.

30 mikrolitrů ligační reakce obsahovalo ligační pufr (New England Biolabs, Beverly, MA), 60 nmolů PmeI-digerovaného pBI-121, 3 mikrolitry 1 mikromolu zásobního roztoku tepelně hybridizovaného loxB/loxC, 4 jednotky PmeI a 4000 jednotek vysoko koncentrované T4 DNA ligasy (New England Biolabs, Beverly, MA). Ligace byla provedena při 16 °C přes noc. Jeden ke čtyřem mikrolitrům ligační reakce byly elektroporovány do E.coli XL1 Blue cells (Stratagene) a uloženy na LB plotny obsahující 50 mikrogramů/ml kanamycinu, 50 mikrolitrů 20 mg/ml X-gal a 10 mikrolitrů 100 mM IPTG. Bílé kolonie byly sebrány do čerstvých LB-kanamycinových základních ploten.

Kolonie obsahující lox místo byly identifikovány hybridizací kolonií. Základní plotny byly pěstovány po dobu 4 hodin při 37 °C, zabaleny do nylonových membrán (MSI). Membrány byly uloženy na čerstvé kanamycinové plotny a kultivovány při 37 °C přes noc. Membrány byly plaveny na 0,5 molárním NaOH po dobu 10 minut, neutralizovány plavením na 0,5 M tris-HCl (pH 8,0) obsahující 0,5 M NaCl po dobu 2 minut a omyty v 2 X SSC.

Membrány byly předhybridizovány ve 20 ml 6 X SSPE 5 X Denhardtově roztoku, 0,5% SDS a 100 mikrog/ml fragmentované sledové spermatové DNA při 55 °C po dobu 3 hodin. Předhybridizační roztok byl nahrazen 10 ml čerstvého roztoku obsahujícího $8,4 \cdot 10^6$ cpm loxC značeného na 5' konci [^{32}P] za použití T4 polynukleotidové kinasy. 50 mikrolitrová značkovácí reakce obsahovala 50 pmol loxC, polynukleotidový kinasní reakční pufr (Promega), 15 mikrolitrů 3 000 Ci/mmol [^{-32}P] ATP (Du Pont-NEN) a 20 jednotek T4 polynukleotidové kinasy (Promega). Reakce byla inkubována při 37 °C po dobu 10 minut a produkt byl oddělen od nezačleněné ATP pomocí Sephadex G-25 otáčivé kolony. Hybridizace byla provedena při 55 °C přes noc.

Filtry byly promyty při 55 °C dvakrát ve 100 ml 2 X SSC obsahujícího 0,5 % SDS, 1 ml 1 X SSC obsahujícího 0,5 % SDS a radioznačeny jak je dříve popsáno. Několik kolonií jak bylo zjištěno, hybridizovalo intenzivně a byly vybrány pro další charakterizaci. Plasmid DNA byl extrahován pomocí Magic Minipreps DNA Purification System[®] (Promega) a digеровán PmeI jak je popsáno výše.

Plasmidy obsahující lox místo nadále nemají PmeI místo. Plasmidy, které byly rezistentní vůči digesci pomocí PmeI byly nadále analyzovány automatizovaným DNA sekvencováním na University of Hawaii Biotechnology Service Center, aby se potvrdila inserce lox místa.

Plasmid obsahující lox místo v požadované orientaci byl digеровán s HindIII smíšeným s loxA/loxB heteroduplexem, který obsahuje HindIII kohesní konce, ale ne u plné HindIII restriční místo, tepelně hybridizovány jak je výše popsáno a podrobeny ligaci. Ligační reakce obsahovala 2,5 mikrog HindIII digеровaného plasmidu, 1,25 pmol loxA/loxB, ligační pufr (Promega), 6 jednotek T4 DNA ligasy (Promega), 1,25 jednotek HindIII (Promega) v konečném objemu 30 mikrolitrů.

Reakce byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 1 hod., zahřívána při 80 °C po dobu 10 minut a zavedena do E.coli XL1-Blue Cells elektroporací (Stratagene). Náhodné plasmidy byly roztrženy podle ztráty HindIII místa pomocí digesce s HindIII jak je uvedeno výše. Konečné potvrzení plasmidové struktury označené pKR1 bylo získáno DNA sekvencováním, jak je popsáno výše.

Digerace pKR1 byla provedena s SacI. 173 mikrolitrů reakce obsahovalo 10 mikrogramů pKR1, multijaderný pufr (Promega) a 20 jednotek SacI (Promega). Po 1 hodině při 37 °C bylo přidáno 0,7 mikrolitrů 25 mM zásoby dATP, dCTP, dGTP a dTTP a 10 jednotek T4 DNA polymerasy (Promega). Tato reakce, která vytvoří SacI digesční produkty se zarovnanými konci, byla inkubována při 15 °C po dobu 30 minut. Po inaktivaci T4 DNA polymerasy inkubací při 75 °C po dobu 15 minut bylo přidáno 24 jednotek SmaI a reakce byla inkubována při teplotě místnosti po dobu 2 hodin.

Reakce byla zastavena zahříváním při 80 °C po dobu 15 minut. DNA byla vysrážena přidavkem 17 mikrolitrů 3M octanu sodného a 375 mikrolitry 100%ního ethanolu. Po 1 hodině při -70 °C byla DNA získána odstředěním v mikroadstředivce při plné rychlosti po dobu 20 minut při 4 °C. DNA byla promyta 70%ním ethanolem, vysušena za vakua a rozpuštěna v 88 mikrolitrech vody. Bylo přidáno 10 mikrolitrů 10 X telecího intestinálního alkalického fosfatasového pufru (Promega) a 20 jednotek telecího intestinálního alkalického fosfatasy a reakce byla inkubována při 37 °C po dobu 2 hodin.

Reakce byla zastavena přidavkem 4 mikrolitrů 0,5M EDTA a zahříváním při 75 °C po dobu 10 hodin. Vzorek byl extrahován stejným objemem vodou nasyceného fenolu, pak stejným objemem fenol:chloroform (1:1) a nakonec chloroformem. DNA byla získána vysrážením po přidavku 0,1 objemu 3M octanu sodného a 0,5 objemů 100%ního ethanolu.

Kávové ACC synthasové a ACC oxidasové cDNA inzerty byly uvolněny z původních plasmidů, pACS a pACO, za použití restrikčních enzymů následovně. 10 mikrogramů pACS plasmidu bylo digerováno ve 100 ml obsahujících 10 mikrolitrů 10 X Multicore Buffer (Promega), a 40 jednotek SmaI. Po inkubaci při 25 °C přes noc bylo přidáno 40 jednotek BsrSI a reakce pokračovala při 67 °C. Po 2 hodinách při 67 °C byla reakční zkumavka ochlazená v ledu po dobu 10 minut, načež následovala inkubace při 37 °C.

Reakční směs byla doplněna jedním mikrolitrem 10 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP a dTTP), 1 mikrolitrem 1 mg/ml acetylované BSA a 15 jednotkami T4 DNA polymerasy (Promega). Reakce byla inkubována při 37 °C po dobu 5 minut, aby se vytvořila DNA se zarovnanými konci. Po inaktivaci T4 DNA polymerasy inkubací při 75 °C po dobu 30 minut byl objem redukován na 50 mikrolitrů ve Speed-Vac[®]. Digescí produkty byly odděleny elektroforézou na 1%ním SeaPlaque agarosovém gelu. 1,6 kb kávové ACC synthasové cDNA bylo excisováno z agarosového gelu a cDNA inzert získán digescí agarosy s 1,12 jednotkami Agar ace (Promega).

Po inkubaci při 45 °C po dobu 30 minut byla vysrážena cDNA přidávkem 24 mikrolitrů 3M octanu sodného (pH 5,2) a 600 mikrolitrů 95%ního ethanolu. Ethanolem vysrážená cDNA byla odstředěna po dobu 30 minut při teplotě místnosti, supernatant odstraněn a pelety byly promyty ledově studeným 70%ním ethanolem a odstředěny jak je výše uvedeno. Pelety byly rozpuštěny ve 100 mikrolitrech vody a následně použity k zarovnaně koncové ligaci do pKRI vektorů.

ACC oxidasový cDNA inzert byl připraven podobným způsobem popsaným pro pACS cDNA výše. 10 mikrogramů pACO plasmidu bylo digerováno v 10 mikrolitrech obsahujících 10 mikrolitrů 10 X pufu C (Promega), 1 mikrolitr 1 mg/ml acetylované BSA, 30 jednotek BalI a 30 jednotek bamboo.

Po inkubaci při 37 °C po dobu 2 hodin byla reakční směs doplněna 1 mikrol 10mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP a dTTP) a 15 jednotkami T4 DNA polymerasy (Promega). Reakce byla inkubována při 37 °C po dobu 5 minut k vyvolání zarovnaných konců.

Po inaktivaci T4 DNA polymerasy inkubací při 75 °C po dobu 30 minut byl objem redukován na 50 mikrolitrů ve Speed-Wac®.

Digesční produkty byly odděleny elektroforézou na 1% SeaPlaque agarosovém gelu. 1 kb kávové ACC oxidasové cDNA byl excisován z agarosového gelu a cDNA insert získán - digescí agarosy s 1,12 jednotkami Agar Ace (Promega). Vyčištění cDNA insertu z agarosy bylo takové, jak je popsáno pro ACC synthasový insert. Pelety byly rozpuštěny v 50 ml vody a následně použity při zarovnané ligaci do pKR1 vektoru.

Vyčištěné ACC synthasové a ACC oxidasové inserty byly vázány do pKR1 vektoru mícháním 500 ng pKR1 vektoru SmaI/SacI fragmentu zarovnaně zakončeného a fosfatasovaného) a 150 ng buď ACC synthasového nebo ACC oxidasového insertu v oddělených zkumavkách. Objem každé vektor/insertové směsi byl redukován na 8 mikrolitrů za použití Speed-Vac®. Do každé z vektor/insertových zkumavek byl přidán 1 mikrolitr 10 X ligo-
sového pufru (Promega) a 1 mikrolitr T4 DNA ligasy (10 jednotek). Obsahy byly inkubovány při 8 °C po dobu 48 hodin.

1 mikrolitr každého ligačního produktu byl smíchán se 40 mikrolitry XL-1 Blue cells (dříve připravenými pro elektroporaci a uskladněnými při -70 °C) a elektroporován za použití "Electro Cell Manipulator 600" (ECM 600, BTX Inc., CA) při 2,35 kV po dobu 5 msec. Bezprostředně po elektroporaci byl přidán do každé zkumavky 1 ml LB pufru a inkubace byla provedena v rotační třepačce po dobu 1 hodiny při 250 otáčkách/min. Po inkubaci byly bakterie vysráženy odstředěním při 1400 otáčkách za minutu po dobu 2 minut a objem byl redukován na 100 mikrolitrů.

50 mikrolitrů směsi bylo uloženo do LB ploten obsahujících 40 mikrog/ml kanamycinu a inkubováno přes noc při 37 °C. Kolonie rostoucí v kanamycinových plotnách byly dále tříděny k identifikaci klonů, které zahrnují ACC synthasové nebo ACC oxidasové inserty. Individuální klony byly sklizeny za použití sterilních zubních párátek a uloženy na čerstvé LB-kanamycinové plotny v mřížovém vzoru. Existovaly 3 plotny pro každý cDNA insert (ACC synthasu a ACC oxidasu). Po růstu přes noc v mřížce byly bakterie replikovatelně uloženy v Magna nylonových membránách (MSI, MA). Membrány byly postupně zpracovány v 10%ním SDS po dobu 5 minut, 0,5M NaOH a 1,5M NaCl po dobu 15 minut, 0,5M tris-HCl a 1,5M NaCl po dobu 15 minut a 2 X SSC a 0,2M tris-HCl po dobu 5 minut. Membrány byly ponechány na vzduchu sušit a usušeny při 80 °C po dobu 20 minut, a zesíťeny 120 000 mikrojoulů UV záření (Strata Linker UV crosslinker 1800, Stratagene, CA).

Membrány byly předhybridizovány po dobu 2 hodin v 6 X SSPE, 5X Denhardtova roztoku, 0,5 % SDS a 100 mikrog/ml sledové spermatové DNA při 65 °C. Nukleotidové sondy pro ACC synthasu a ACC oxidasu byly syntetizovány za použití Ready-to Go DNA značících kuliček (Pharmacia). 50 ng každého cDNA insertu bylo denaturováno varem ve 45 mikrolitrech vody a zchlazeno v ledu. 45 mikrol denaturované DNA bylo smícháno s Ready-to Go DNA značících kuliček a 5 mikrol [³²P] dCTP (3000Ci/mmol) a inkubováno při 37 °C po dobu 30 minut. Po syntéze nukleotidové sondy byly zkumavky zahřáty ve vodě po dobu 4 minut a zchlazeny v ledu. Předhybridizační pufr byl odstraněn a 10 ml předehřátého hybridizačního pufru (6 X SSPE, 0,5 % SDS a 100 mikrog/ml sledové spermatové DNA) bylo uloženo do každé hybridizační láhve, načež následoval přídavek denaturované nukleotidové sondy. Hybridizace byla provedena přes noc při 65 °C.

Membrány byly promyty krátce 2 X SSC a 0,5%ním SDS. Druhé promytí tímž puřrem bylo provedeno po dobu 30 minut. Membrány byly promyty dvakrát 0,2 X SSC a 0,5 X SDS. Každé promytí trvalo 30 minut. Membrány pak byly autoradiografovány. 5 pKRI klonů s ACC synthasou a 24 klonů s ACC oxidasou bylo identifikováno po vyvolání autoradiogramu. Orientace genů v každém klonu byla identifikována pomocí PCR, restriční digesce a sekvencování vektor/insertového spoje.

Špetka bakteriální kolonie z každého z 29 klonů (5 ACC synthasy a 24 ACC oxidasy) byla sebrána pomocí zubních párátek a suspendována ve 20 mikrolitrech sterilní Milli-Q vody (buněčné ředidlo). 25 mikrolitrů PCR reakcí obsahovalo 2 mikrolitry výše uvedených zředěných buněk, 0,5 mikrolitrů 10mM zásoby každého dATP, dCTP, dGTP a dTTP, 1,5 mikrolitru 25mM MgCl₂ a 2,5 mikrolitru 10 X puřru (Promega), 1 mikrolitr každého ze tří 20 mikrom primerů uvedených dále, 0,3 mikrol 5 jednotek/mikrolitr Taq DNA polymerasy (Promega) a 16,2 mikrolitrů sterilní Milli-Q vody.

Primery použité pro ACC synthasové klony byly: 35S primer (5'-CCA CTA TCC TTC GCA AGA CC-3'), ACSR₇ (5'-TTG CCA TCT TCG ACA AGA CT-3') a ACSL₄ (5'-CTG TTG TCA GCT GTG CTA-3').

Podobně primery použité pro ACC oxidasové klony byly: 35S primer, ACOR₄ (5'-GGA CTT CTG AGA TGT TGG AA-3') a ACOL₁ (5'-TGG TGG AGA GCA AGG AAT TG-3').

Tepelné cyklovací podmínky byly 10 minut při 94 °C, 35 cyklů 1 minutu při 94 °C, 1 minutu při 50 °C, 1 minutu při 72 °C a 5 minut při 72 °C. Očekávané rozměry PCR produktů pro pKRI/ACC synthasový konstrukt byly 320 párů bází (35S a ACSR₇) pro negativní orientaci a 850 párů bází (35S a ACSL₄) pro pozitivní orientaci. Podobně očekávané produkty pro

pKRL/ACC oxidasový konstrukt byly 400 párů bází (35S a ACOR₄) pro negativní orientaci a 800 párů bází (35S a ACOL₁) pro pozitivní orientaci.

Pro jak ACC synthasu tak ACC oxidasu 1 plasmid každý s cDNA v negativním a v pozitivním směru byly dále analyzovány DENA sekvencováním spojení mezi plasmidem a cDNA k potvrzení orientace. DNA sekvencování bylo provedeno jak je dříve popsáno. Binární vektory s ACC synthasovým genem v pozitivní orientaci (označeným pKRCACS-A), ACC synthasou v negativní orientaci (pKRCACS-S), ACC oxidasou v pozitivní orientaci (pKRCACO-A) a ACC oxidasou v negativní orientaci (pKRCACO-S) jsou znázorněny v obr. 1 až 4, které jsou zde připojeny.

b) Elektroporace Agrobacteria s pKRL plasmidem obsahujícím ACC synthasový (pKRCACS-S a pKRCACS-A) a ACC oxidasový (pKRCACO-S a pKRCACO-A) cDNA gen v negativní a pozitivní orientaci

Agrobacterium kmen LBA 4404 byl vypěstován z jedné kolonie na OD₆₀₀ v 100 ml YM kapalném mediu (0,4 g/l kvasnicový extrakt, 10 g/l mannitol, 0,1 g/l NaCl, 0,2 g/l MgSO₄·7H₂O, 0,5 g/l K₂HPO₄, pH 7,5) v rotační třepačce při 29 °C po dobu 48 hodin. Buňky byly koncentrovány odstředěním při 4000.g na 6.10¹¹ buněk/ml. Elektroporace byla provedena za použití "Electro Cell Manipulator 600" (ECM 600, BTX Inc., CA). 3,5 mikrolitrový alikvot buď pKRCACS-A, pKRCACO-A, pKRCACS-S nebo pKRCACO-S plasmidového roztoku obsahujícího 200 ng DNA byl smíchán s 50 mikrolitry koncentrovaných Agrobacteria buněk a převeden do předem ochlazené 2mm mezerové kyvety (BTX Inc., CA) a byl aplikován 5 msec puls při 2,35 kV.

Byl přidán 1 ml YM kapalného média obsahujícího 50 mikrog/ml kanamycinu do elektroporovaných buněk a ty byly ponechány k odebrání po dobu 1 hodiny při 29 °C v třepačce při 250 otáčkách za minutu. Buňky byly odstředěny při 4000.g a resuspendovány v 1000 mikrol čerstvého YM kapalného média. Transformované bakterie byly vytrženy na YM-agarových plotnách (YM kapalném mediu obsahující 15 g/l Bacto-agaru) doplněných 50 mikrogram/ml kanamycinu.

Potvrzení *Agrobacterium* transformace po inkubaci při 29 °C po dobu 48 hodin bylo získáno sebráním 10 kolonií z každé transformace do čerstvých YM-agar/kanamycinových ploten na vyznačené mřížce. Přítomnost a orientace ACC synthasových a ACC oxidasových genaových insertů byla určena PCR za použití 35S primeru ve spojení s jedním z vnitřních genově specifických primerů. Malé množství každé kolonie bylo převedeno do 20 mikrolitrové sterilní Milli-Q vody za použití sterilního zubního párátko.

PCR reakce byly provedeny jak je výše popsáno za použití 2 mikrolitrů těchto buněčných suspenzí jako matriční DNA. Pro ACC synthasovou negativní orientaci byly použity 35S a ACSR₇ primery a vytvořily produkt očekávané velikosti, 320 párů bází. ACC synthasové pozitivní primery 35S a ACSL₄ poskytly očekávaný produkt 850 párů bází. Podobně pro ACC oxidasovou negativní orientaci 35S a ACOR₄ primery byly použity a produkovaly produkt očekávané velikosti, 400 párů bází. ACC oxidasové pozitivní primery 35S a ACOL₁ poskytly očekávaný produkt 800 párů bází. Byla vyselektována jedna kolonie každé orientace pro transformaci kávovníkové listové tkáně.

c) Infekce kávovníkové listové tkáně Agrobakteriemi obsahujícími pKRCACS-S, pKRCACO-S, pKRCACS-A a pKRCACO-A plasmidy

Vyvinuté mladé kávovníkové listy z plagiotropních výhonů byly sterilizovány v 30%ním Cloroxu po dobu 30 minut a omyty 3x v sterilizované destilované vodě. Přibližně 7 mm² kousky z lístku mezi středním žebrem a okrajem byly vyříznuty a uloženy v MS kapalné mediu (Murishige a Skoog, 1962) s Agrobakteriovou suspenzí 10⁹ buněk/ml a kokultivovány po dobu 3 hodin. Listová tkáň byla odsáta do sucha sterilizovanými papírovými ubrousky a kokultivovány zbývajícími Agrobakteriemi po dobu 3 dní na MS mediu ztuženém přídatkem 2,0 g/l Phytagelu.

Listová tkáň byla znovu vysáta sterilními papírovými ubrousky, čímž se odstranily zbývající Agrobakterie a pak převedena do media vytvářejícího zával (MS medium obsahující 2,4-D a kinetin, Sondahl a Sharp, 1977) obsahujícího 500 mikrog/ml karbenicilinu a buď 100 až 300 mikrog/ml kanamycinmonosulfátu nebo 10 až 20 mikrogr/ml geneticinu (G418). Po 13 dnech kultivace při 25 °C v tmě se začal objevovat primární kalus.

d) Subkultivace kávovníkové listové závalové tkáně obsahující pKRCACS-S, pKRCACO-S, pKRCACS-A nebo pKRCACO-A plasmidy

Antibioticky rezistentní závaly byly subkultivovány měsíčně za použití embryonálního indukčního media M II (bazální soli, polokoncentrované MS soli, 10 mg thiamin.HCl, 40 mg cystein.HCl, 100 mg myoinositolu, 40 g sacharosy, 20 mg BA, 10 mg pyridoxinu, 100 mg nikotinové kyseliny, 2,0 g fytagelu, pH 5,65, Yasuda a Fujii, 1985) obsahujícího 300 mikrog/ml karbenicilinu a 150 až 200 mikrog/ml kanamycinu po dobu 3 měsíců. Tyto závaly byly pak subkultivovány po dobu 30 dnů v M II mediu obsahujícím 100 mikrog/ml kanamycinu a po dalších 30 dnů

v M II mediu obsahujícím 50 mikrogr/ml kanamycinu. Somatická embrya se vytvořila v tomto posledním mediu. Somatická embrya vyvinutá do rostlinek na germinačním mediu M III bez růstových regulátorů (bazální soli, plnokonzentrované MS soli 10 mg thiamin.HCl, 40 mg cystein.HCl, 100 mg myoinositolu, 40 g sacharosu, 2 g fytogelu, pH 5,65, Sondahl a Sharp, 1977) pod fluorescenčním ozářením.

PV 450-99
~~17987~~

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. V podstatě čistá ACC synthasa z kávovníkové rostliny zahrnující aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10.
2. ACC synthasa podle nároku 1, kde kávovníkem je *Coffea arabica*.
3. V podstatě čistá nukleokyselinová sekvence, která kóduje expresy ACC synthasy vytvořené kávovníkem a obsahující nukleotidovou sekvenci uvedenou v sekv.id.č.11.
4. V podstatě čistá nukleokyselinová sekvence, která kóduje expresy ACC synthasy vytvořené kávovníkem, kde ACC synthasa má aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10.
5. V podstatě čistá ACC oxidasa z kávovníku obsahujícího aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.
6. ACC oxidasa podle nároku 5, kde kávovníkem je *Coffea arabica*.
7. V podstatě čistá nukleokyselinová sekvence, která kóduje expresi ACC oxidasy tvořené kávovníkem a obsahující nukleotidovou sekvenci uvedenou v sekv.id.č.13.
8. V podstatě čistá nukleokyselinová sekvence, která kóduje expresi ACC oxidasy vytvořené kávovníkem, kde ACC oxidasa má aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.
9. Nukleokyselinová sekvence podle kteréhokoli z nároků 3, 4, 7 nebo 8, kde kávovníkem je *Coffea arabica*.

10. Kávovník transformovaný nukleokyselinovou sekvencí izolovanou z kávovníku, kde nukleokyselinová sekvence kóduje transkripci NRA, která je antimediatorová k mRNA, která kóduje expresi ACC synthasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id. č.10, kde RNA má délku dostatečnou interferenci s expresí ACC synthasy.
11. Kávovník transformovaný nukleokyselinovou sekvencí izolovanou z kávovníku, kde nukleokyselinová sekvence kóduje transkripci NRA, která je antimediatorová k mRNA, která kóduje expresi ACC oxidasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12, kde RNA má délku dostatečnou k interferenci s expresí ACC oxidasy.
12. Kávovník transformovaný (I) nukleokyselinovou sekvencí podle nároku 7 a (ii) nukleokyselinovou sekvencí podle nároku 8.
13. Kávovník transformovaný nukleokyselinovou sekvencí izolovanou z kávovníku, kde nukleokyselinová sekvence kóduje transkripci NRA a je antimediatorová k mRNA, která kóduje expresi ACC synthasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10, kde RNA má délku dostatečnou k interferenci s expresí ACC synthasy.
14. Kávovník transformovaný nukleokyselinovou sekvencí izolovanou z kávovníku, kde nukleokyselinová sekvence kóduje transkripci NRA, která je antimediatorová k mRNA, která kóduje expresi ACC oxidasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12, přičemž RNA má délku dostatečnou k interferenci s expresí ACC oxidasy.
15. Kávovník transformovaný (I) nukleokyselinovou sekvencí podle nároku 13 a (ii) nukleokyselinovou sekvencí podle nároku 14.

16. Kávovník transformovaný izolovanou nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje expresi aminokyselinové sekvence sekv. id.č.10.

17. Kávovník podle nároku 16, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci.

18. Kávovník podle nároku 16, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v negativní orientaci.

19. Kávovník transformovaný izolovanou nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje expresi pro aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

20. Kávovník podle nároku 19, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci.

21. Kávovník podle nároku 19, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v negativní orientaci.

22. Kávovník transformovaný první izolovanou nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje expresi pro aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10 a druhou izolovanou nukleovou kyselinou obsahující nukleotidovou sekvenci, která kóduje expresi pro aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

23. Kávovník podle nároku 22, kde alespoň jedna z první nebo druhé nukleokyselinové sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci.

24. Transformovaný kávovník vytvořený způsobem inserce do rostlinného genomu nukleokyselinové sekvence izolované z kávovníku, které kóduje transkripci na RNA, která je pozitivní k mRNA, která kóduje expresi na ACC synthasu mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10.

25. Transformovaný kávovník vytvořený způsobem inserce do rostlinného genomu nukleokyselinové sekvence izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která je pozitivní k mRNA, která kóduje expresi na ACC oxidasu mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

26. Transformovaný kávovník vytvořený způsobem inserce do rostlinného genomu (i) nukleokyselinové sekvence izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která je pozitivní k mRNA, která kóduje expresi pro ACC synthasu mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10 a (ii) nukleokyselinové sekvence izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která je antimediatorová k mRNA, která kóduje expresi na ACC oxidasu mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

27. Transformovaný kávovník vytvořený způsobem inserce do rostlinného genomu nukleokyselinové sekvence izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která je negativní k mRNA, která kóduje expresi pro ACC synthasu mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10.

28. Transformovaný kávovník vytvořený způsobem inserce do rostlinného genomu nukleokyselinové sekvence izolované z kávovníku, která kóduje transkripci pro NRA, která je negativní k mRNA, která kóduje expresi pro ACC oxidasu mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

29. Transformovaný kávovník vytvořený způsobem inserce do rostlinného genomu (i) nukleokyselinové sekvence

izolované z kávovníku, která kóduje transkripci pro RNA, která je negativní k mRNA, která kóduje expresi pro ACC synthasu mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10 a (ii) nukleokyselinové sekvence izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která je negativní k mRNA, která kóduje na expresi pro ACC oxidasu mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

30. Kávové zrno z kávovníku podle kteréhokoli z nároků 19 až 29.

31. Transformační vektor zahrnující transkripční promotor operabilně vázaný k

- (a) nukleokyselinové sekvenci sekv.id.č.11, nebo
- (b) nukleokyselinovou sekvenci, která kóduje expresi pro aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10, nebo
- (c) nukleokyselinovou sekvenci sekv.id.č.13, nebo
- (d) nukleokyselinovou sekvenci, která kóduje expresi na aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

32. Transformační vektor podle nároku 31, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v negativní orientaci.

33. Transformační vektor podle nároku 31, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci.

34. Kávovníková buňka transformovaná izolovanou nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje expresi pro aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10.

35. Kávovníková buňka podle nároku 34, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci.

36. Kávovníková buňka podle nároku 34, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v negativní orientaci.

37. Kávovníková buňka transformovaná izolovanou nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje expresi na aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

38. Kávovníková buňka podle nároku 37, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci.

39. Kávovníková rostlina podle nároku 37, kde je nukleokyselinová sekvence operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v negativní orientaci.

40. Kávovníková buňka transformovaná (i) izolovanou nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje expresi pro aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10 a (ii) izolovanou nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje expresi na aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

41. Kávovníková buňka podle nároku 40, kde alespoň jedna z nukleokyselinových sekvencí je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci.

42. Kávovníková buňka podle nároku 40, kde alespoň jedna z nukleokyselinových sekvencí je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v negativní orientaci.

43. Transformovaná kávovníková buňka vytvořená způsobem inserce transformačního vektoru do kávovníkové buňky, přičemž transformační vektor zahrnuje transkripční promotor operabilně vázaný k (i) izolované nukleokyselinové sekvenci, která

kóduje expresi na aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10, nebo (ii) k izolované nukleokyselinové sekvenci, která kóduje expresi pro aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

44. Transformovaná kávovníková buňka podle nároku 43, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčním promotoru v negativní orientaci.

45. Transformovaná kávovníková buňka podle nároku 43, kde nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčním promotoru v pozitivní orientaci.

46. Transformovaná kávovníková buňka vytvořená způsobem inserce prvního transformačního vektoru a druhého transformačního vektoru do kávovníkové buňky, přičemž první transformační vektor zahrnuje transkripční promotor operabilně vázaný k izolované nukleokyselinové sekvenci, která kóduje expresi na aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10 a druhý transformační vektor zahrnuje transkripční promotor operabilně vázaný k izolované nukleokyselinové sekvenci, která kóduje expresi na aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12.

47. Transformovaná kávovníková buňka podle nároku 46, kde alespoň jedna z nukleokyselinových sekvencí je operabilně vázána k jejímu transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci.

48. Kávovník regenerovaný z transformované kávovníkové buňky podle kteréhokoli z nároků 34 až 47.

49. Kávové zrno z kteréhokoli kávovníku z nároku 48.

50. Způsob transformování kávovníkové buňky nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje transkripci na RNA, která je pozitivní k mRNA, která kóduje na ACC syntasu z kávovníku,

vyznačený tím, že se vytvoří transformační vektor zahrnující nukleokyselinovou sekvenci izolovanou z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která má délku dostatečnou k interferenci s expresí ACC synthasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10, přičemž nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci, a transformační vektor se zavede do kávovníkové buňky, kde nukleokyselinová sekvence se pak začlení do genomu kávovníkové buňky.

51. Způsob transformace kávovníkové buňky nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje transkripci na RNA, která je pozitivní k mRNA, která kóduje na ACC oxidasu z kávovníku, vyznačený tím, že se vytvoří transformační vektor zahrnující nukleokyselinovou sekvenci izolovanou z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která má délku dostatečnou k interferenci s expresí ACC oxidasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12, přičemž nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci, a transformační vektor se zavede do kávovníkové buňky, přičemž nukleokyselinová sekvence se pak stane začleněnou do genomu kávovníkové buňky.

52. Způsob transformace kávovníkové buňky (i) nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje transkripci na RNA, která je pozitivní k mRNA, která kóduje na ACC synthasu z kávovníku, a (ii) nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje transkripci na RNA, která je pozitivní k mRNA, která kóduje a ACC oxidasu z kávovníku vyznačený tím, že se vytvoří první transformační vektor zahrnující první transkripční promotor operabilně vázaný k první nukleokyselinové sekvenci izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která má délku dostatečnou k interferenci s expresí ACC synthasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10,

vytvoří se druhý transformační vektor zahrnující druhý transkripční promotor operabilně vázaný k druhé nukleokyselinové sekvenci izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která má dostatečnou délku i interferenci s expresí s ACC oxidasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12, přičemž alespoň jedna z první nebo druhé nukleokyselinové sekvence je operabilně vázána k jejímu transkripčnímu promotoru v pozitivní orientaci, a

každý z transformačních vektorů se zavede do kávovníkové buňky, přičemž každá z nukleokyselinových sekvencí se pak stane začleněnou do genomu kávovníkové buňky.

53. Způsob transformace kávovníkové buňky nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje transkripci na RNA, která je negativní orientace vůči mRNA, která kóduje na ACC synthasu z kávovníkové rostliny, vyznačený tím, že se vytvoří transformační vektor zahrnující transkripční promotor operabilně vázaný k nukleokyselinové sekvenci izolované z kávovníku, která kóduje transkripci pro RNA, která má dostatečnou délku k interferenci s expresí ACC synthasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv. id.č.10, přičemž nukleokyselinová sekvence je operabilně vázána k promotoru v negativní orientaci a

transformační vektor se zavede do kávovníkové buňky, přičemž nukleokyselinová sekvence se pak začlení do genomu kávovníkové buňky.

54. Způsob transformace kávovníkové buňky nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje na transkripci pro RNA, která je negativní orientace k mRNA, která kóduje ACC oxidasu z kávovníku, vyznačený tím, že se vytvoří transformační vektor zahrnující transkripční promotor operabilně vázaný k nukleokyselinové sekvenci z kávovníku, která kóduje na RNA, která má délku dostatečnou k interferenci s expresí ACC oxidasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12, přičemž nukleokyselinová sekvence

je operabilně vázána k transkripčnímu promotoru v negativní orientaci, a

transformační vektor se zavede do kávovníkové buňky, přičemž nukleokyselinová sekvence se pak stane začleněnou do genomu kávovníkové buňky.

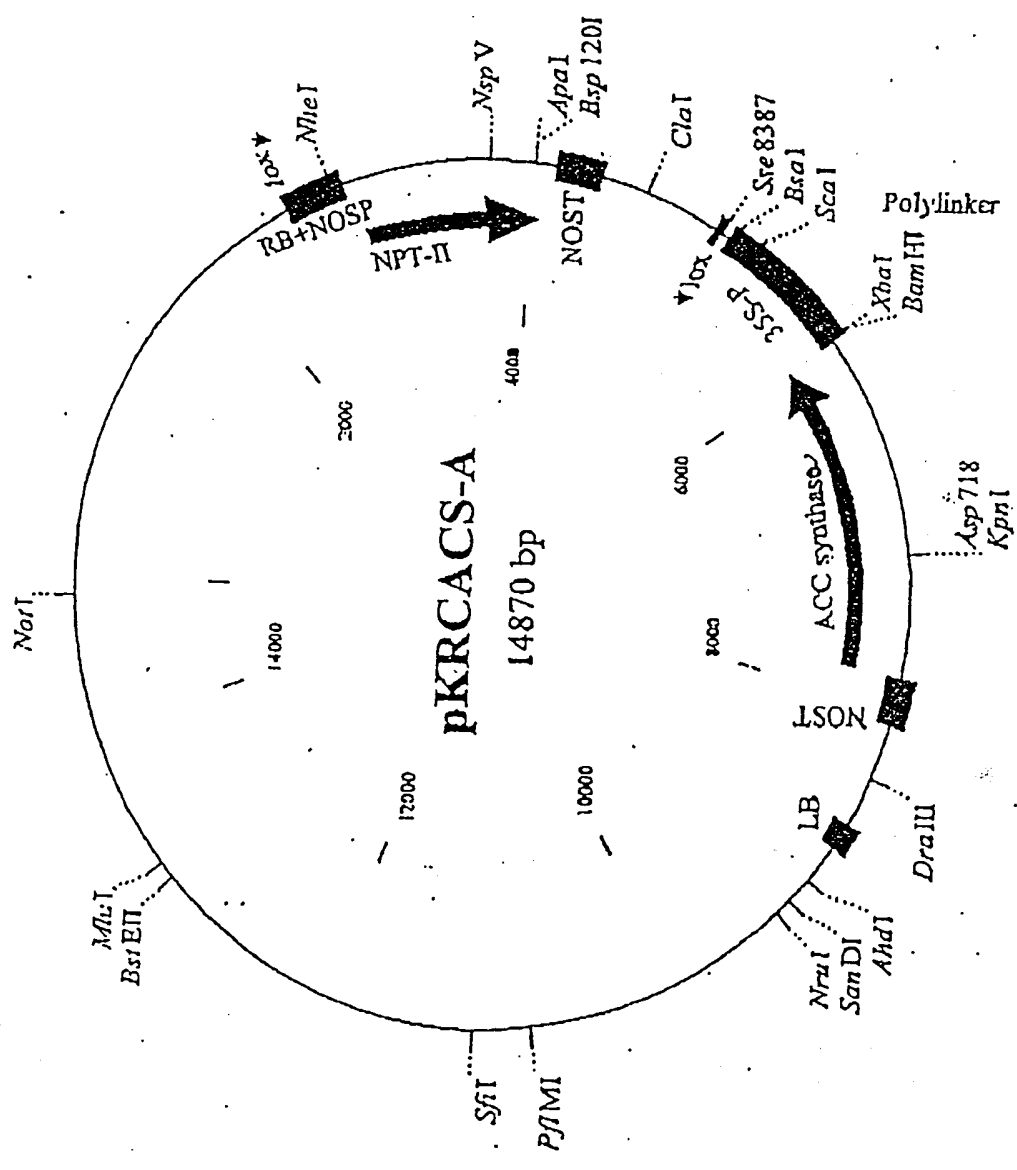
55. Způsob transformace kávovníkové buňky (i) nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje transkripci na RNA, která je negativní orientace vůči mRNA, která kóduje ACC syntasu z kávovníku, a (ii) nukleokyselinovou sekvencí, která kóduje transkripci na RNA, která je negativní orientace k mRNA, která kóduje ACC oxidasu z kávovníku, vyznačený tím, že se vytvoří první transformační vektor zahrnující první transkripční promotor operabilně vázaný k první nukleokyselinové sekvenci izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která má dostatečnou délku k interferenci s expresí ACC syntasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.10,

vytvoří se druhý transformační vektor zahrnující druhý transkripční promotor operabilně vázaný k druhé nukleokyselinové sekvenci izolované z kávovníku, která kóduje transkripci na RNA, která má délku dostatečnou k interferenci s expresí ACC oxidasy mající aminokyselinovou sekvenci sekv.id.č.12,

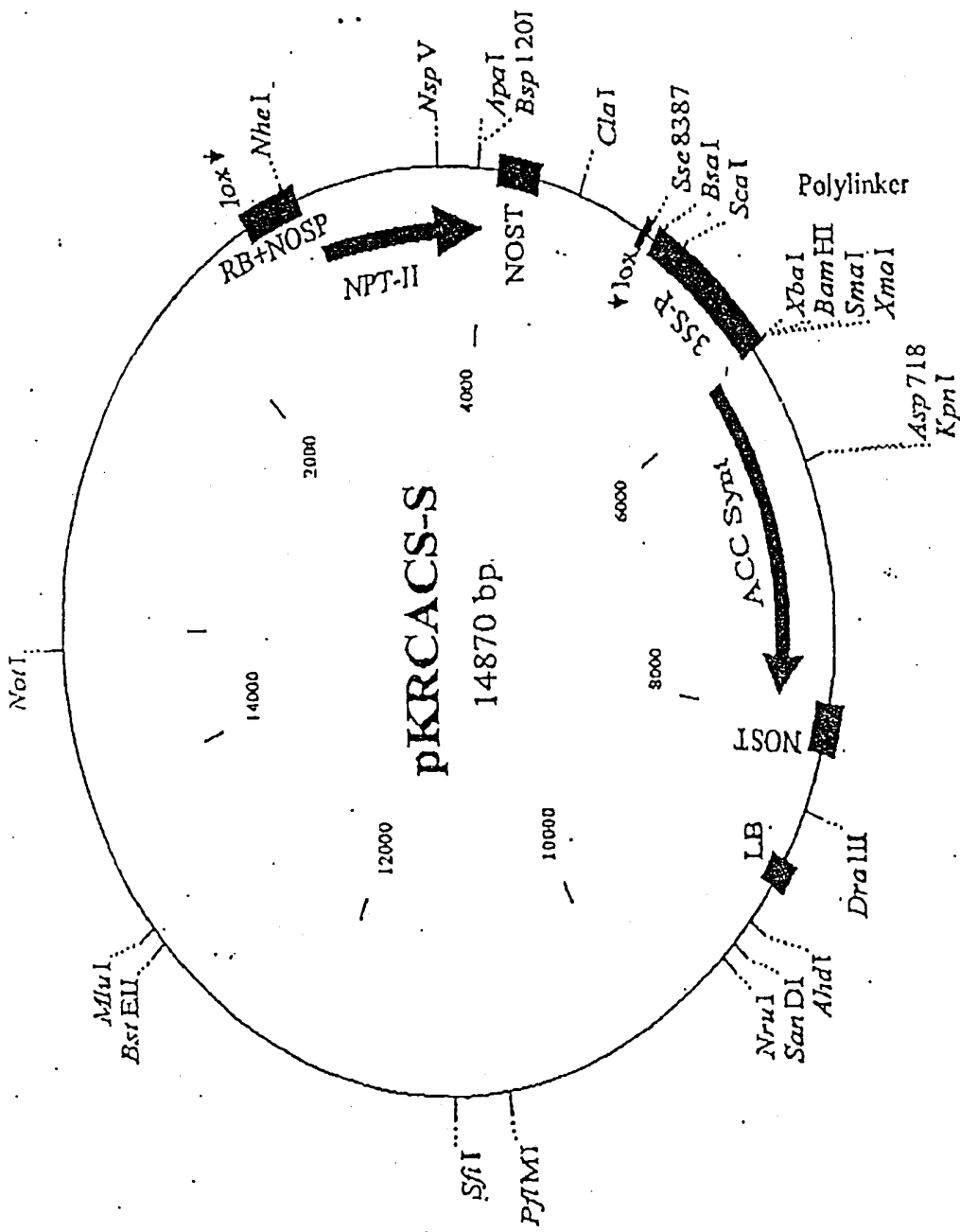
přičemž alespoň jedna z nukleokyselinových sekvencí je operabilně vázána k jejímu transkripčnímu promotoru v negativní orientaci, a

každý z transformačních vektorů se zavede do kávovníkové buňky, přičemž každá z nukleokyselinových sekvencí se pak stává začleněnou do genomu kávovníkové buňky.

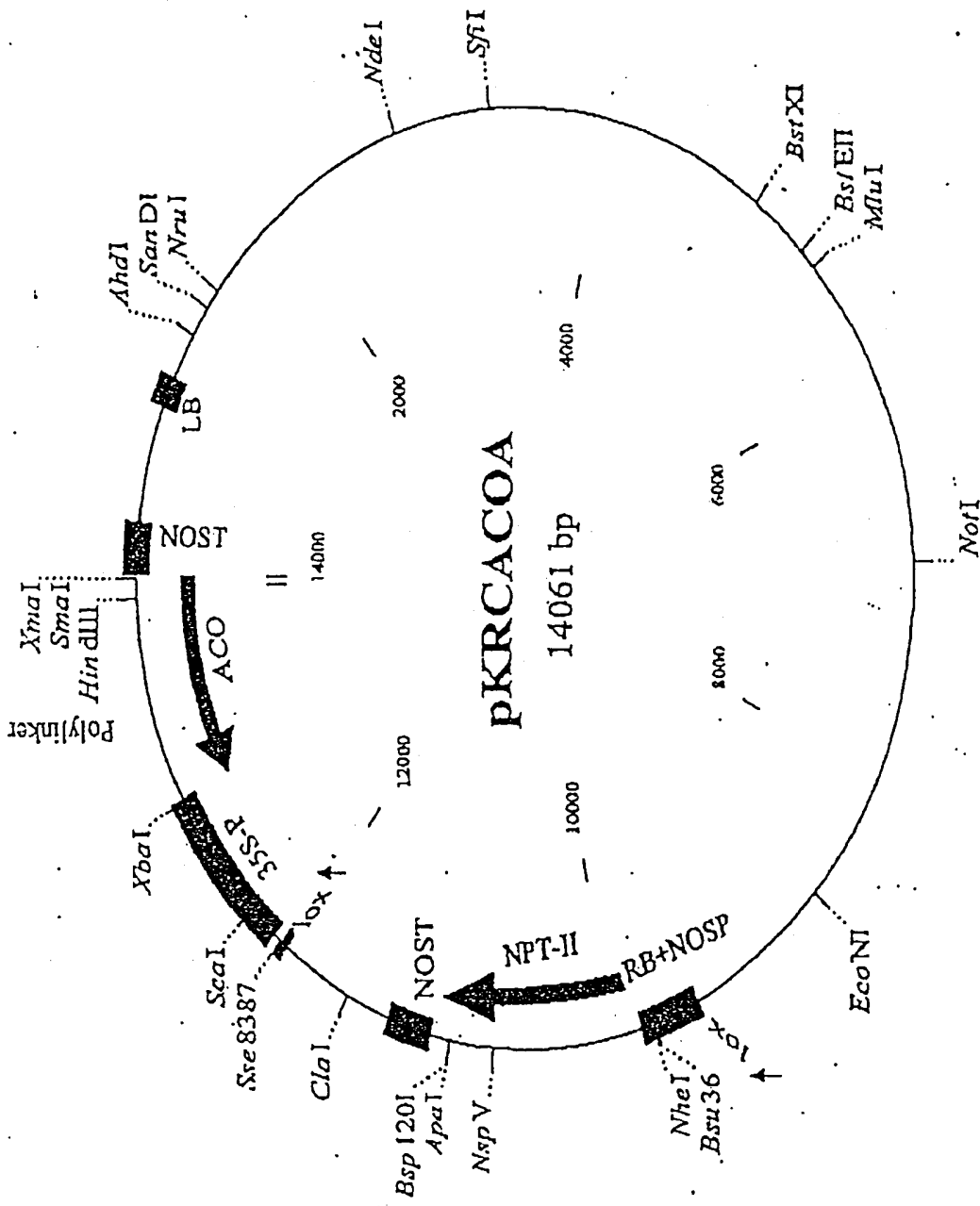
Zastupuje: JUDr. Ing. Milan Hořejš



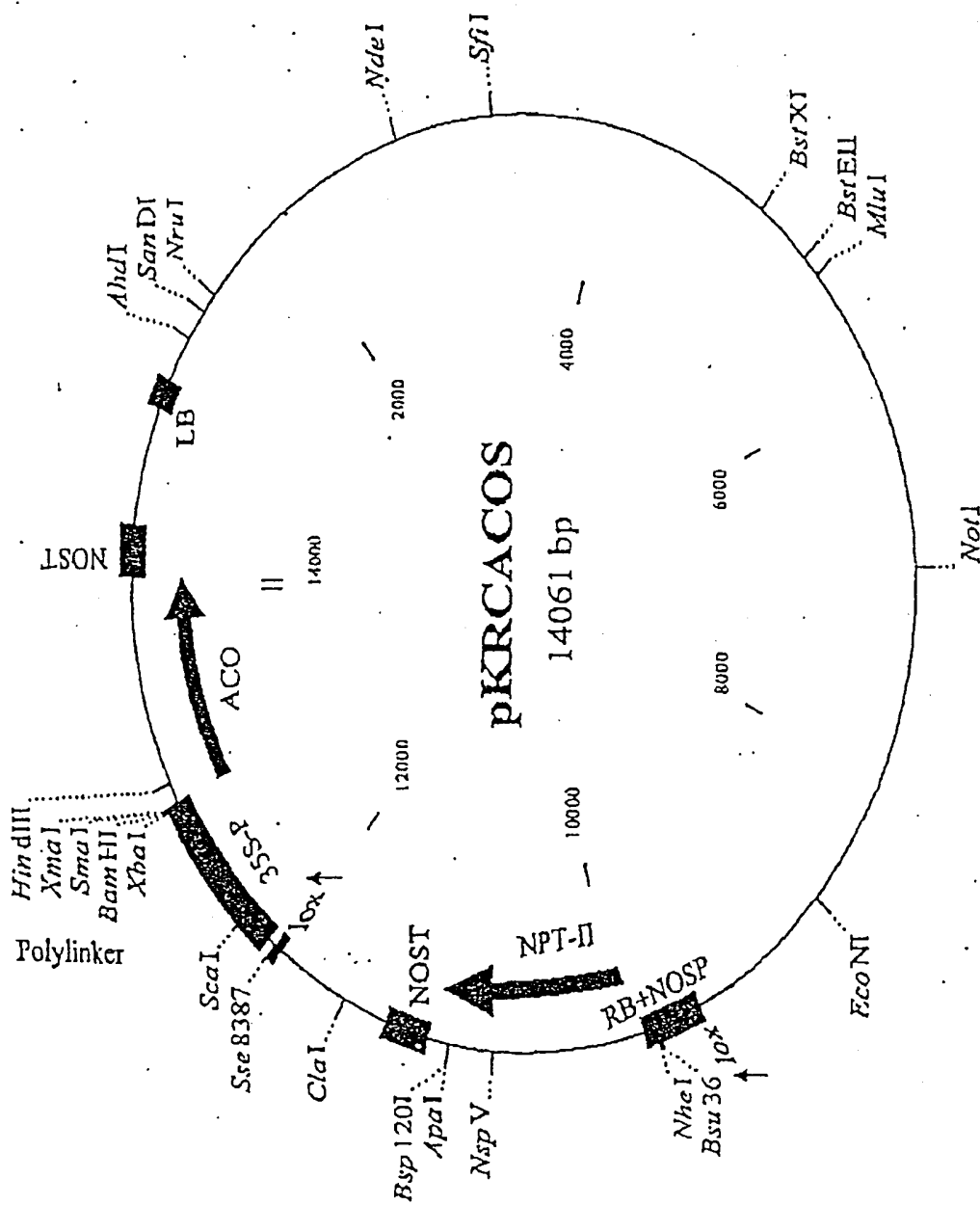
Obr. 1 Kávcová ACC syntasová pozitivní cDNA v pKRI



Obr. 2 Kárová ACC syntasová negativní cDNA v pKRI



Obr. 3 Kávové ACC oxidasová pozitivní čDKA v pKRI



Obr. 4 · Kérová ACC oxidasová negativní cDNA v pKRI