

63.927/SZE

## KIVONAT

**Egy gén növénybe való bejuttatására szolgáló vektor, valamint transzgenikus növények  
létrehozására szolgáló módszerek és a gének növényekbe való többszörös bejuttatása  
ezen vektorok használatával**

Bejelentő: Nippon Paper Industries Co., Ltd., TOKIÓ, JP

A bejelentés napja: 1995. november 8.

A bejelentés elsőbbsége: 1994 november 9. (Hei- 6-311399) JP

1995. május 31. (Hei. 7-170123) JP

1995. október 4. (Hei. 7-293254) JP

1995. október 25. (Hei. 7-313432) JP

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/JP95/02283

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/15252

Egy kívánt gén növénybe való bejuttatására szolgáló vektor azzal jellemezve, hogy a kívánt gént, és marker génként legalább két morfológiai rendellenességet indukáló gént (MAI) tartalmaz, vagy mely vektor a kívánt gént, legalább egy MAI gént és egy eltávolítható elemet tartalmaz. Egy marker gén hatásától mentes transzgenikus növény létrehozására szolgáló eljárás. A kívánt gének növénybe való nagy számú bejuttatására szolgáló módszer.

A meghatalmazott

P 9702174

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**



S.B.G. &  
Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda

63.927/SZE

H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

A

**Egy gén növénybe való bejuttatására szolgáló vektor, valamint transzgenikus növények  
létrehozására szolgáló módszerek és a gének növényekbe való többszörös bejuttatása  
ezen vektorok használatával**

Bejelentő: Nippon Paper Industries Co., Ltd., TOKIÓ, JP

Feltalálók: Hiroyasu Ebinuma

Koichi Sugita

Etsuko Matsunaga

Mikiko Yamakado TOKIÓ, JP

A bejelentés napja: 1995. november 8.

A bejelentés elsőbbsége: 1994 november 9. (Hei- 6-311399) JP

1995. május 31. (Hei. 7-170123) JP

1995. október 4. (Hei. 7-293254) JP

1995. október 25. (Hei. 7-313432) JP

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/JP95/02283

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/15252.

## A tudomány technikai területe

A jelen találmány egy olyan új vektorral kapcsolatos, mely vektor egy kívánt gén növénybe való bejuttatására szolgál, a bejuttatás során génszétválasztási módszereket használunk egy transzgenikus növény kinyerése céljából, egy olyan transzgenikus növény előállítására szolgáló módszert biztosít, mely növény mentes egy marker gén hatásától; és a jelen találmány kapcsolatos egy olyan módszerrel is, mely legalább két kívánt gén növénybe való bejuttatására szolgál ezen vektor használata segítségével.

## A találmány háttere

A gyógyszerként használható fiziológiailag aktív anyagok termelésében jelenleg a mikroorganizmusok transzformációját és a sejtenyészést használják génszétválasztási eljárások alkalmazása segítségével, így jelentős szerepet tölt be az iparban. A növénynemesítés területén a génszétválasztás ipari alkalmazása lemaradt, miután a növények életciklusa sokkal hosszabb, mint a mikroorganizmusoké. Azonban, miután ez a technológia lehetővé teszi egy kívánt gén közvetlenül a termesztendő növénybe való bejuttatását, a következő előnyökkel jár a klasszikus nemesítéssel szemben, ami többszörös keresztezést tesz szükségessé.

- (a) Lehetőség van csupán egy javítandó tulajdonság bejuttatására.
- (b) Lehetőség van a növényektől eltérő más fajok (például mikroorganizmusok és hasonlók) tulajdonságainak bejuttatására .
- (c) Lehetőség van a termesztési periódus jelentős rövidítésére.

Így a növény nemesítéshez való génszétválasztási módszereket széleskörűen vizsgálták.

A transzgenikus növények létrehozása a következő három lépést teszi szükségessé.

- (1) A kívánt gén növényi sejtbe való bejuttatása (ideértve ugyanennek a kromoszómákba, sejtmagokba és hasonlókba való bejuttatását).
- (2) Azon sejtekből, melyekbe a kívánt gént bejuttattuk, növényi szövetet szelektálunk.
- (3) A szelektált növényi szövetből növényt regeneráltatunk.

Egy olyan transzgenikus szövet szelektálásához, melybe a kívánt gént már bejuttattuk, kívánatos a szövet - melyben a kívánt gén expresszálódik - vizuális azonosítása az új növény regeneráltatása nélkül. Ennek megvalósításához a kívánt gént a növényi sejtbe tipikusan egy marker génnel együtt juttatjuk be, melynek expressziója könnyen detektálható a sejtek tenyésztésének stádiumában. Azaz, egy marker gén expresszióját használjuk a kívánt gén bejuttatása indexének. A hagyományos marker génekre szolgáló példák közé tartoznak az antibiotikum rezisztencia gének, mint például a kanamicin rezisztencia gén (azaz az NPTII, neomicin foszfortranszferáz gén), egy higromicin rezisztencia gén (azaz HPT, higromicin foszfortranszferáz gén), aminosav szintetáz gének, mint egy nopalin szintetáz gén (NOS) egy oktopin szintetáz gén (OCS) és egy szulfonil-karbamid rezisztencia gén (azaz ALS, acetoacetát szintetáz gén), mely mezőgazdasági kémiai rezisztenciát biztosít.

Azonban egy marker gén expressziója komoly problémákat okozhat ha egy ilyen transzgenikus növényt élelmiszerként használunk. Ez azt jelenti, hogy meglehetősen nehéz azt biztosítani, hogy egy marker gén expressziója révén termelt géntermék biztonságos legyen az emberi test számára. Következésképpen, ha egy marker gént tartalmazó transzgenikus növényt élelmiszerként szándékoznak árusítani, részletes vizsgálatot kell folytatni a marker gén emberi testre kifejtett hatásának meghatározása céljából. Például, az 1980-as évek eleje óta laboratóriumi szinten az NPTII gént használják marker génként. 1994-ben ezen gén termékét végül az US Food and Drug Administration (FDA) elfogadta élelmiszer adalékként. Azóta a marker génként az NPTII gént tartalmazó transzgenikus növényeket élelmiszeripari célokra is

használják. Azonban az NPTII gént tartalmazó termékeket fogyasztó emberek közül még mindig van olyan, aki aggódik a gén hatásával kapcsolatban.

Ezenkívül, a marker gének, melyeket gyakorlatilag felhasználnak, mint például az NPTII gén, csupán olyan gének, melyek hozzájárulnak a növényi sejtekben levő növekedést gátló anyagok detoxifikációjához. Ezért az olyan transzgenikus növényi szövetek szelektálásához, melyekbe egy kívánt gént bejuttattunk, a szövetet a növekedést gátló anyagot tartalmazó tenyész tápközegeben szaporítjuk és a marker gén expresszióját, nevezetesen a növekedést gátló anyaggal szembeni szövet rezisztenciát, értékeljük és használjuk indexként. Azonban, még ha a szövet rendelkezik is ilyen rezisztenciával, egy gátló anyag jelentlétében való tenyésztés eredményezhet a növényi sejtek számára káros mellékhatásokat, mint például a szaporodásban bekövetkező csökkenést és a transzgenikus szövet redifferenciálódását.

Ezenkívül, egy növényi sejtben egy marker gén expressziója a transzgenikus szövet szelektálása után komolyan megakadályozza a növény ezt követő gén bejuttatással történő nemesítését. Azaz ha egy másik gént juttatunk be egy marker gént tartalmazó transzgenikus növénybe, a gén bejuttatást egy másik marker gén használatával nyomón kell követni. Azonban egy marker gén hatékonysága növény fajonként változik. Ezért előzetesen egy olyan tesztre van szükség, melynek során az egyes marker génekhez való körülményeket meghatározzuk (például arról számoltak be, hogy a HPT gén sokkal hatékonyabb rizsben, mint az NPTII gén (K. Shimamoto et al., Nature (London), vol.338, p.274, 1989). Ezenkívül, mivel a marker gének variációja korlátozott, egy gén többszörös bejuttatása nem ismételtető meg egyszerűen úgy, hogy a marker gént megváltoztatjuk. Azaz egy adott növénybe a gén bejuttatások száma magában korlátozott a marker gének adott növényben való felhasználható variációinak köszönhetően. Ezenkívül, a valójában felhasználható marker gének típusa is a fent említettek szerint korlátozott. Ennek megfelelően, szükség van egy olyan módszerre, melynek segítségével a marker gén eltávolítható a kromoszómából a transzgenikus növényi

szövet szelekciója után a marker gén hatásának sejtől, szövetből és növényből való kizárása céljából.

Egy marker gén hatásának megszüntetésével kapcsolatban két módszerről számoltak be. Az egyik során egy marker gént és a növény egy transzpozonját juttatják be a növényi kromoszómába, majd ezt követően eltávolítják onnan a transzpozont követően (International Laid-Open No WO 92/01370). Egy második módszerben a P1 fág hely-specifikus rekombinációs rendszerét használják a transzpozon helyett (International Laid-Open No WO 93/01283). Ezen módszereket használva lehetséges egy olyan sejtet nyerni, melyben a marker gént egy adott arányban távolítjuk el a növényi kromoszómából a gén bejuttatása után. Sajnos annak valószínűsége, hogy a marker gént eltávolítottuk nagyon kicsi.

Ezenkívül, azok a növényi sejtek, melyekben a marker gént a fenti módszerekkel eltávolítottuk a kromoszómából az olyan sejtek között szóródnak szét, melyekben a marker gén még mindig jelen van és expresszálódik. Ez a kétféle sejt vizuálisan nem különböztethető meg.

A marker géneket és a kívánt gént tartalmazó növényi sejteket kémiai rezisztenciájuk, tápanyag igényük és más hasonló tulajdonságaik alapján szelektáljuk. Azonban a szelekció idején a marker géneket nem tartalmazó sejtek súlyos növekedési gátlást mutatnak és számos esetben tönkre is mennek. Ennek megfelelően, ezek a szelekciók nem alkalmazhatók a marker géneket nem tartalmazó sejtek szelektálására.

Az olyan növényi sejtek fent említett módszerekkel való nyeréséhez, melyekből a marker gén hiányzik, de melyek a kívánt gént tartalmazzák a növény szövetet, melyben a marker gént nem tartalmazó sejtek a marker géneket tartalmazó sejtekkel össze vannak keveredve, szaporítjuk, regeneráltatjuk, majd a szelekcióra analizáljuk, például Southern hibridizációs módszert használva, vagy polimeráz lánc reakciót használva. Ez a módszer arra a feltételre alapul, hogy a regenerált egyed egy egyedüli sejtől származik és így az összes

növényi sejt ugyanolyan tulajdonságokkal rendelkezik. Így a marker gént nem tartalmazó sejtől származó egyed csupán ilyen sejtekből épül fel. Sajnos, az ilyen regeneráltatott egyedek alkotó sejtek nem szükségképpen egységesek. A marker génes kromoszómát nem tartalmazó sejtek és a marker gént tartalmazó sejtek együtt léteznek és meglehetősen szabálytalanul oszlanak meg még ugyanabban a regeneráltatott növény egyedben valamint annak ugyanazon szövetén belül is. Így különösen nehéz olyan egyedeket nyerni, melyek csupán a marker gént nem tartalmazó sejtekből áll olyan állapotban, amikor a tenyésztett szövetet újra differenciáltatjuk az egyed regeneráltatása céljából.

Ezenkívül, a szelekció ismert analitikai módszerei egy szövetet, például egy levelet használnak teszt mintaként (nem pedig a teljes egyedeket vagy egy egyedüli sejtet). Következésképpen csupán az átfogó tendenciát analizáljuk az egy levélben levő marker gén állapota tekintetében. Ezenkívül, ebben az esetben általános, hogy a marker gén-mentes sejt és a marker gént tartalmazó sejt jelen van ugyanabban az egyedben vagy szövetben. Így még ha csupán egy marker gén mentes sejtekből álló egyedeket hozunk is létre, nehéz azt szelektálni. Még ha a marker gén jelenlétét nem is detektáljuk a szövetben, ugyanezen egyed más helyeiről származó szövetek tartalmazhatják a marker gént, vagy egyszerűen azt mutatják, hogy a marker gén mennyisége a detektálhatósági határ alatt van. Így lehetetlen meghatározni, hogy a teszt minta teljesen marker gén-mentes sejtekből áll-e.

A fent említett módszereket használva a marker gént nem tartalmazó egyed csupán egy csíra sejtől nyerhető, mint például pollenből, egy petesejtből és más hasonlókból. Ha az önmegporzást egy olyan petesejtet használva végezzük el, melyből hiányzik a marker gén, egy marker gén mentes megtermékenyített petesejtet nyerünk meghatározott arányban a klasszikus öröklődési törvények szerint és ebből a megtermékenyített petesejtből egy olyan egyedeket hozunk létre, melyek csupán a megtermékenyített petesejt tulajdonságaival azonos tulajdonságokkal rendelkező sejtekből áll. Hagyományos analitikai módszerek, mint például a

Southern hibridizáció végezhető el ezekkel az egyedekkel. Nevezetesen, ha marker gént nem tartalmazó sejteket hozunk is létre az itt hivatkozott, leírt módszer szerint, az ilyen sejtekből álló egyed az első alkalommal az ilyen sejteket tartalmazó tenyésztett szövetből történő növény redifferenciáltatással nyerhető, majd az F1 vagy későbbi generációk leszármazottainak nyerésével. Az így nyert egyed a marker gént nem tartalmazó egyedként szelektálható.

A marker gén transzgenikus növényből való eltávolításához a JP-A-6-276872 egy a gén bejuttatásra szolgáló technikát ír le, melyben a marker gént egy szeparált, a kívánt gént tartalmazó vektortól különböző plazmid vektorba inzertálják. A marker gént tartalmazó plazmidot eltávolítják a sejtől a gén bejuttatás befejezése után (a "JP-A" a találmány szerinti használatban Japán közzétett szabadalmi alkalmazást jelent). Azonban ez a technika egy keresztezési lépést is tartalmaz a marker gén eltávolításához. Ebben a tekintetben ez a technika a fent említett két jelentésben említettel azonos.

A fenti módszereket nehéz elvégezni fás növények esetében, melyek hosszú növekedési periódussal rendelkeznek, steril egyedekkel vagy olyan hibridekkel, melyekben maga F1 is értékes. Ezenkívül, ha eltávolítható DNS elemeket, mint például egy transzpozont vagy más hasonlót használunk, az ezen elemek kromoszómális DNS-ből, vírus vektor DNS-ből vagy más hasonló olyan elemekből, ahol ezek jelen vannak, való eltávolítási aránya tipikusan kiemelkedően alacsony. Ennek megfelelően, szükséges, hogy ezen elemek eltávolítása (nevezetesen a marker gén eltávolítása) könnyen detektálható legyen, valójában, legalább a tenyésztett szövet állapotában. Ha ez nem detektálható a tenyésztett szövet redifferenciáltatása és egy későbbi generáció létrejötte előtt a regeneráltatott egyed keresztezésén keresztül a módszer kivihetetlen.



Ennek megfelelően, a jelen találmány egy tárgya olyan vektor biztosítása, mely egy a növénybe bejuttatandó gént és egy marker gént tartalmaz, ahol az illet tartalmazó növény nincs káros hatással az emberi testre elfogyasztás esetén, akkor sem, ha a marker gén expresszálódik.

A jelen találmány egy másik célja egy kívánt gén növénybe való bejuttatására szolgáló vektor biztosítása, ahol a vektor egy olyan marker gént tartalmaz, mely lehetővé teszi a transzgenikus szövet szelekcióját a növényi sejt növekedést gátló anyag használata nélkül, mely anyag csökkenti a növényi sejt aktivitását.

A jelen találmány egy másik célja egy kívánt gén növénybe való bejuttatására szolgáló vektor biztosítása, ahol a vektor egy marker gént tartalmaz és úgy működik, hogy a marker gén hatását megszünteti a marker gén azon DNS-ből való eltávolítása segítségével, melyben a marker gén jelen van és funkcionál. Ezt a vaktort használva a kívánt gén ismételt bejuttatható hatékonyan.

A találmány egy további célja egy olyan módszer biztosítása, mely egy ilyen vektor használatán keresztül egy transzgenikus növény előállítására szolgál, mely vektor a marker gén hatását megszünteti, anélkül, hogy az F1 vagy későbbi generációk keresztezéssel megvalósított termesztésének lépésén keresztül menne, valamint egy olyan lépés biztosítása, mely a gének többszörös növénybe való bejuttatását biztosítják a fent leírt módszer használatán keresztül.

A jelen találmány ezen és más célját megvalósítottuk egy olyan vektor használatával, mely egy kívánt gént és marker génként legalább egy morfológiai rendellenességet indukáló gént (a találmányban "MAI"-ként utalunk rá) tartalmaz.

Ezenkívül, a jelen találmány ezen és más céljai megvalósításra kerültek egy ilyen vektor használatával, ahol a marker gént expressziója után eltávolítottuk a DNS-ből. A marker

gén expressziója és a marker gén funkciójának eltűnése azon szövet morfológiai változásain keresztül detektálhatók, mely szövetbe a marker gént bejuttattuk.

Ezenkívül, a jelen találmány ezen és más céljait megvalósítottuk egy olyan vektor használatával, mely a kívánt gént, marker génként legalább egy MAI gént és egy eltávolítható DNS elemet tartalmaz. A MAI gént úgy pozicionáltuk, hogy szervesen együtt funkcionáljon az eltávolítható DNS elemmel. A kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy ne működjön együtt az eltávolítható DNS elemmel.

Ezenkívül, a jelen találmány ezen és egyéb céljai egy olyan módszerrel valósíthatók meg, mely egy marker gén hatásától mentes transzgenikus növény létrehozására szolgál, a módszer a következő lépéseket foglalja magába:

(A) egy növényi sejtbe egy olyan vektort juttatunk be, mely említett vektor a kívánt gént, szelektálható marker génként legalább egy MAI gént és egy eltávolítható DNS elemet tartalmaz, ahol az említett MAI gént úgy pozicionáltuk, hogy együtt funkcionál az eltávolítható DNS elemmel és ahol az említett kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy nem funkcionál együtt az eltávolítható DNS elemmel,

(B) az (A) lépésben nyert növényi sejtet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag rendellenes növényi szövetet detektáljuk, és az említett morfológiailag rendellenes szövetet szelektáljuk,

(C) a (B) lépésben szelektált említett morfológiailag rendellenes szövetet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag normális szövetet detektáljuk és az említett morfológiailag normális szövetet szelektáljuk.

Ezenkívül a jelen találmány ezen és más céljait úgy valósítjuk meg, hogy egy olyan módszert használunk, mely legalább két kívánt gén növénybe való bejuttatására szolgál, a módszer a következő lépések legalább kétszeri elvégzését foglalja magába:

(A) egy növényi sejtbe egy olyan vektort juttatunk be, mely említett vektor a kívánt gént, szelektálható marker génként legalább egy MAI gént és egy eltávolítható DNS elemet tartalmaz, ahol az említett MAI gént úgy pozicionáltuk, hogy együtt funkcionál az eltávolítható DNS elemmel és ahol az említett kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy nem funkcionál együtt az eltávolítható DNS elemmel,

(B) az (A) lépésben nyert növényi sejtet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag rendellenes növényi szövetet detektáljuk, és az említett morfológiailag rendellenes szövetet szelektáljuk,

(C) a (B) lépésben szelektált említett morfológiailag rendellenes szövetet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag normális szövetet detektáljuk és az említett morfológiailag normális szövetet szelektáljuk.

Ezenkívül, a jelen találmány ezen és más céljait úgy valósítjuk meg, hogy egy növényt regeneráltatunk a fent leírt morfológiailag normális szövet tenyésztésével.

#### A rajzok rövid leírása

1. ábra - a Ti plazmid és az *A. tumefaciens* PO22-es törzs T-DNS-én levő PstI fragment restrikciós endonukleáz térképének diagrammja.
2. ábra - a pIPT2 plazmid szerkezetének diagrammja.
3. ábra - a pIPT2 plazmidból származó pIPT3 plazmid szerkezetének diagrammja.
4. ábra - A pIPT3 plazmidból származó pIPT4 plazmid szerkezetének diagrammja.
5. ábra - A pIPT4 plazmid szerkezetében levő T-DNS-en levő restrikciós endonukleáz térképe.
6. ábra - Egy dohány extrém módon elágazó fenotípusának PCR analízises eredményeit mutatja, mely dohányba a pIPT4 plazmidot használva egy gént juttattunk be.

7. ábra - A pNPI102 plazmid szerkezetének diagrammja.
8. ábra a pIPT4 és pNPI102 plazmidokból származó pNPI103 plazmid szerkezetének diagrammja.
9. ábra - a pNPI103 plazmidból származó pNPI106 plazmid szerkezetének diagrammja.
10. ábra - a pNPI106 plazmid szerkezetében egy T-DNS régió restrikciós endonukleáz térképe.
11. ábra - a 2-es számú hajtásról készült fénykép a 2. példában bemutatott termesztés 2 hónapja után.
12. ábra - a 8-as számú hajtásról készült fénykép a 2. példában bemutatott termesztés 1 hónapja után.
13. ábra - A 2. példa 8-as számú hajtása PCR analízisének eredményei.
14. ábra - A 3. példában a 13-1 és 14-1 számú hajtásokból nyert normális egyedek PCR analízisének eredményei.
15. ábra - A 3. példában bemutatott dohány extrém módon hajtásos fenotípusából differenciáltatott normális hajtások fényképe.
16. ábra - A 2. példában bemutatott 7-es számú hajtásból származó levélből nyert normális egyed PCR analízisének eredményei.
17. ábra - A pNPI128 plazmid szerkezetének diagrammja.
18. ábra - A pNPI128 plazmidból származó pNPI129 plazmid szerkezetének diagrammja.
19. ábra - A pNPI101 és pNPI129 plazmidokból származó pNPI132 plazmid szerkezetének diagrammja.
20. ábra a pNPI132 szerkezetében a T-DNS régió restrikciós endonukleáz térképe.
21. ábra - Az 5. példában a 15-21 számú hajtásokból nyert normális egyedek PCR analízisének eredményei mely eredményeket olyan primereket használva nyertünk, melyekben egy ipt gén jelenlétét detektáltuk.

22. ábra - Az 5. példában a 15-21 számú hajtásokból nyert normális egyedek PCR analízisének eredményei mely eredményeket olyan primereket használva nyertünk, melyekben egy sor Rs, ideértve az ipt gént is, által tartott régió eliminációját detektáltuk.
23. ábra - Az 5. példában a 15-21 számú hajtásokból nyert normális egyedek PCR analízisének eredményei, ahol olyan primereket használtunk, melyekben a GUS gén jelenlétét detektáltuk.
24. ábra - Az olyan vonalból nyert normális egyedek PCR analízisének eredményei, ahol a vonal nem képes az 5. példában bemutatott extrém módon elágazó fenotípust létrehozni.
25. ábra - A pNPI702 plazmid szerkezetének diagrammja.
26. ábra - A pNPI702 szerkezetben levő T-DNS régió restrikciós endonukleáz térképet mutatja.
27. ábra - Egy a 7. példában bemutatott hibrid rezgőnyár extrém módon elágazó fenotípusából nyert differenciált normális hajtások fényképe.
28. ábra - A pNPI140 plazmid szerkezetében a T-DNS régió restrikciós endonukleáz térképet mutatja.
29. ábra - A 8. példában bemutatott többszörös gén bejuttatás utáni extrém módon hajtásos fentotípusból differenciált normális hajtás PCR analízisének eredményei.

A találmány szerinti használatban a MAI gén egy olyan gén, mely egy növény szövetét morfológiailag rendellenes differenciálódásra indukálja, például törpenövésre, az apikális dominancia megsemmisítésére, a korona gall betegség létrejöttét, a szőrös gyökér kialakulását, a levelek pöndörödését és más hasonlókat. Az előnyben részesített MAI géneket tekintve az *Agrobacterium* vagy más hasonló nemzetség baktériumaiból izolált, és különböző növényekben tumort vagy teratomát (például mellékajtások és mellék gyökerek képződése) indukáló gének használhatók. A MAI gének variációira szolgáló példák közé tartoznak például a citokinin szintézises gének (például az ipt (izopentenil transzferáz) gén (A.C. Smigocki, L.D. Owen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p.5131, 1988), az iaaM (triptofán monooxygenáz) gén (H.J. Klee et al., GENES and DEVELOPMENT, vol.1, p.86, 1987), az 5-ös gén (H. Körber et al., EMBO Journal, vol. 10, p.3983, 1991) a 6b gén (P.J.J. Hoyaas et al., Plant Mol. Biol. Vol.11, p.791, 1988) és a rol gének, mint például a rolA, a rolB, a rolC és a rolD (F.F. White et al., J. Bacteriol., vol.164, p.33, 1985). Ezenkívül, ezek példái magukba foglalják az iaaL gént (indolecetsav-lizin szintetáz gén), mint *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (A. Spena et al., Mol. Gen. Genet., vol. 227, p.205, 1991), a homeo box géneket és a különböző növényekben levő fitokróm géneket. Előnyösen a citokinin szintézises gént, mint például az ipt gént vagy legalább egy a rol gének közül szelektált gént (még előnyösebben a rolA-t, rolB-t és rolC-t tartalmazó rol géneket) használjuk. Az ipt gén az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS-ében van jelen és az apikális dominancia megsemmisítését indukálja. A rolA-t, rolB-t és rolC-t tartalmazó rol gének az *Agrobacterium rhizogenes* T-DNS-ében vannak jelen és ezek közül legalább az egyik szőrös gyökerek képződését, törpeséget, a levelek csavarodottságát és más hasonló rendellenességeket okoz a szőrös gyökérből regeneráltatott növény esetében.

A jelen találmány technikáját alkalmazva, ezen szelektálható marker gének kombinációja tervezhető meg oly módon, hogy egy specifikus szerkezet, mint például egy mellék hajtás egy mellék gyökér vagy valami hasonló redifferenciálódik abban a specifikus növényben, melybe a szelektálható marker gént bejuttatják. A jelen találmányban a MAI gének ilyen kombinációja használható a transzgenikus növény létrehozásához szükséges körülményeknek megfelelően, mint például olyan növény típussal, melybe a gént be szándékszunk juttatni.

A MAI gének sejtbe való bejuttatásával létrehozott morfológiailag rendellenes szövet csupán olyan sejtekből áll, melyek tartalmazzák ezet a gént. Így szelektálható marker génként ezt a gént használva egy vektort szerkesztünk meg a kívánt génnel együtt. Ha ezt a vektort bejuttatjuk a növényi sejtbe és a transzgenikus sejtet szaporítjuk, a csupán olyan sejtekből álló szövet, mely sejtekbe a szelektálható marker gént és a tervezett gént bejuttattuk szelektálható az ezen sejtől létrejött morfológiailag rendellenes szövet vizuális szelektálásával.

A jelen találmánynak megfelelően az alkalmas vektorok olyan DNS szekvenciával rendelkeznek, melyek egy idegen gént juttatnak be a gazdasejtbe és mely az idegent gént a gazda sejtjén belül expresszálja.

Ha a jelen találmány szerinti vektort használjuk a gén bejuttatására, a csupán a transzformált sejtől álló növényi szövet vizuálisan szelektálható a gén bejuttatás folyamata után csupán a sejt tenyésztésével egy általános tenyésztápközegeben, mint például MS (Murashige-Skoog) tápközegeben közönséges tenyésztési körülmények között. Miután nincs szükség speciális anyagokra, például sejt növekedést gátló anyagokra vagy más hasonlókra a transzformált szövet szelekciójához, az eljárás nem csupán egyszerűsödött, de a növényi sejt aktivitását nem is csökkentjük az ilyen anyag használatán keresztül. Ezenkívül, a növény inherens módon tartalmazza a MAI gént, vagy a MAI gén spontán kerül be a növénybe a baktériummal vagy más hasonlóval végzett fertőzés eredményeként. Ennek megfelelően, a

jelen találmány szerinti vektort használva nyert növény nem különbözik a természetesen előforduló növényektől, melyek rendelkeznek ezzel a morfológiai rendellenességgel.

A jelen találmány összhangban a megfelelő vektorok közé tartozik egy olyan vektor, ahol a MAI gént úgy pozicionáltuk, hogy az eltávolítható DNS elemmel együtt fejt ki hatását és a kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy az eltávolítható DNS elemmel nem együtt fejt ki hatását.

A találmány szerinti használat szerint az eltávolítható DNS elem egy DNS szekvencia olyan eleme, mely magában eltávolítható abból a DNS-ből, melyben létezik és funkcionál. Növényekben egy kromoszómában jelen levő transzpozont ismerjük ilyen elemként. A transzpozonok szerkezete, aktivitása és viselkedését majdnem teljesen azonosították. A transzpozon működéséhez elvileg két komponensre van szükség (1) egy enzimre, mely a transzpozonban jelen lévő génből expresszálódik és mely magának a transzpozonnak a kimetszését és transzpozícióját katalizálja (transzpozáz) és (2) DNS kötő szekvenciák, melyek a transzpozon terminális régiójában vannak jelen és melyen a transzpozáz hat. Ezen elemekkel a transzpozon kimetsződik abból a kromoszómából, melyben létezik, majd általában a DNS egy új pozíciójában helyezkedik el. Azonban bizonyos arányban a transzpozon eltűnik áthelyeződés nélkül. A jelen találmány a transzpozon ilyen transzpozíciós hibáit hasznosítja.

A transzpozon a két típus egyike lehet, vagy egy autonóm transzpozon vagy egy nem autonóm transzpozon. Az autonóm transzpozon a két elemet, a transzpozázt és a DNS kötő szekvenciát tartalmazza. Az autonóm transzpozonban a transzpozáz expresszálódik és a működésben levő DNS kötő szekvenciához kötődik, ahol a transzpozon autonóm módon metsződik ki a kromoszómából. A nem autonóm transzpozon visszatartja a terminális DNS kötő szekvenciát, melyhez a transzpozáz a működéshez kötődik. A nem autonóm transzpozonban a transzpozáz gén olyan mutáción megy keresztül, hogy a transzpozáz nem expresszálódik, így a transzpozon nem metszhető ki autonóm módon a kromoszómából.



Azonban, ha egy autonóm transzpozonból vagy egy független transzpozáz génből származó transzpozázt hozzáadunk a nem autonóm transzpozonhoz a nem autonóm transzpozon az autonóm transzpozonhoz hasonlóan kezd működni.

Az autonóm transzpozonokra szolgáló példák közé tartozik a kukoricából izolált Ac és Spm (A.Gieri and H. Saedler, *Plant Mol. Biol.*, vol.19, p.39, 1992). Az Ac úgy nyerhető, hogy a kukorica kromoszómájában levő wx-m7 gén lókuszt Sau3A restrikciós endonukleázzal emésztjük (U. Behrens et al., *Mol. Gen. genet.* vol.194, p.346, 1984). Ez az autonóm transzpozon a leginkább elemzett növényi transzpozon. Valójában, DNS szekvenciáját már meghatározták (M. Müller-Neumann et al., *Mol. Gen. Genet.*, vol.198, p.19, 1984).

A nem autonóm transzpozonokra szolgáló példák közé tartoznak a Ds és a dSpm, melyeket úgy nyertek, hogy sorrendben az Ac és az Spm belső régióit eltávolították (H.-P. Doring and P. Starlinger, *Ann. Rev. Genet.*, vol. 20, p.175, 1986), valamint a számos, a kukoricától eltérő növényből, mint például oroszlánszáj, kerti folyondár izolált transzpozonok (például Y. Inagaki et al., *Plant Cell* vol.6, p.375, 1994). Ha ezeket a transzpozonokat exogén növények kromoszómájába juttatjuk be, ezek a transzpozonok szintén kimetsződnek a kromoszómából és transzpozicionálódnak az aktivitás mutatása során (például B. Baker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 83, p.4844, 1996).

A jelen találmányban az autonóm és a nem autonóm transzpozonok is felhasználhatók. A nem autonóm transzpozonok felhasználhatók, ha ezekbe egy funkcionáló transzpozáz gént juttattunk be.

Egy másik eltávolítható DNS elem, mely a növényekben nincs jelen, de mely a jelen találmánnyal összhangban felhasználható egy hely-specifikus rekombinációs rendszerből származó elem. A hely-specifikus rekombinációs rendszer a következő két elemet tartalmazza: (1) egy jellegzetes DNS szekvenciával rendelkező rekombinációs helyet (mely megfelel a jelen találmány eltávolítható DNS elemének) és (2) egy enzimet, mely specifikusan

kötődik a DNS szekvenciához és katalizálja a DNS szekvenciák közötti rekombinációt ha két vagy több szekvencia létezik (rekombináz). Ha a két DNS szekvencia azonos irányban orientálódik ugyanazon DNS molekula egy adott intervallumában, az ezen DNS szekvenciák által tartott régió kimetsződik a DNS molekulából, például egy plazmidként, kromoszómaként vagy más hasonló egységként. Ha a két DNS szekvencia ellentétes orientációjú ugyanazon DNS molekulán, az ezen DNS szekvenciák által tartott régiók invertálódnak.

A jelen találmány előnyösen a korábbi kimetszést alkalmazza. A rekombinációs helyen belül a kimetszés és az inverzió is előfordulhat a homológ rekombináció eredményeként a hely-specifikus rekombinációs rendszeren keresztül, ami eltér a transzpozonnal használt mechanizmustól. Ismeretes, hogy a rekombináz gén nem szükségszerűen van jelen ugyanabban a DNS molekulában, melyben a rekombinációs hely létezik. A rekombináz génnek csupán arra van szüksége, hogy ugyanabban a sejtben legyen jelen és expresszáldjon a két DNS szekvencia által tartott régió kimetszéséhez vagy invertálásához (N.L. Craig, Annu. Rev. Genet., vol.22, p.77, 1988).

Ezideig, olyan hely-specifikus rekombinációs rendszereket azonosítottak, mint például a fág, a baktérium (például az *E. coli*) élesztőgombák és más hasonló. Az ezen példák közé tartoznak a Cre/lox rendszer, egy pSR1 rendszer, egy FLP rendszer, egy cer rendszer és egy fim rendszer (például N.L. Craig, Annu. Rev. Genet., vol.22, p.17, 1988). Ha a P1 fágból (WO 93/01283) származó Cre/lox rendszer használatával az ezen mikroorganizmusokból szeparált hely-specifikus rekombinációs rendszert egy olyan organizmusba juttatjuk be mely attól az organizmustól, melyből a rendszer származik eltér, akkor ugyanúgy működik, mint az eredeti organizmus. Az élesztőgomba (*Zygosaccharomyces rouxii*) hely-specifikus rekombinációs rendszere (pSR1 rendszer (H. Matsuzaki et al., J. Bacteriology, vol. 172, p. 610, 1990)) szintén felhasználható a jelen találmánnyal összhangban. Ez a pSR1 rendszer

szintén megtartja inherens funkcióját magasabbrendű növényekben (H. Onouchi et al., Nucleic Acid res., vol.19, p. 6373, 1991).

A jelen találmányban a morfológiai rendellenességet indukáló gén (MAI) egy olyan pozícióba inzertálható, ahol ez a gén az eltávolítható DNS elemmel együtt metszhető ki. Például, ha transzpozont használunk eltávolítható DNS elemként, a MAI gén olyan pozícióban inzertálható, mely nem befolyásolja a transzpozon kimetszését és mely a transzpozáz gén promóter régiójától upstream helyezkedik el, de attól a terminális régiótól, melyhez a transzpozáz kapcsolódik, downstream helyezkedik el. Ha a pSR1 rendszert használjuk a MAI gén a rekombináz expresszióját nem gátló jellegzetes DNS szekvenciák által tartott régió belül bármilyen pozícióban inzertálható.

A jelen találmányban a MAI gén előnyösen az eltávolítható DNS elemen belül van jelen. Másrészt viszont a kívánt gén pozíciója különösebben nem korlátozott, azonban előnyösen a kívánt gén az eltávolítható DNS elemen kívül helyezkedik el.

Egy ilyen szerkezetű vektort használva a kívánt gén bejuttatása után a MAI gén bizonyos gyakorisággal eltávolítható az eltávolítható DNS elemmel együtt abból a DNS-ből, melybe bejuttattuk és melyben funkcionál. A kívánt gén, mely nem elválaszthatatlanul funkcionál a szelektálható marker génnel, ugyanabban a DNS-ben marad. A vektor felhasználható egy kívánt gén, bizonyos növénybe való többszörös bejuttatására. Ezenkívül, miután ezen MAI gén funkció vesztese vizuálisan detektálható a tenyésztés során a transzgenikus szövet morfológiai változásaként, a csupán ilyen, a kívánt gént tartalmazó, azonban a szelektálható marker gént nem tartalmazó sejtől álló szövet könnyen szelektálható speciális eljárás szükségessége nélkül. Következésképpen még ha egy ilyen sejt valójában nagyon alacsony arányban keletkezik is, megfelelőképpen szelektálható egy gyakorlatilag hasznos eljárás létrehozásához. Ezenkívül, ezen vektort használva a gén többszörös bejuttatása nem csupán tetszés szerinti számban ismételhető meg, de megismételhető még

mielőtt egy érett növényt regeneráltatnánk. Így a többszörös bejuttatás hatékonyan hajtható végre. A csupán ilyen sejtekből álló egyedi transzgenikus növény előállításához a növény az így szelektált szövetből regeneráltható, a keresztezési lépés végrehajtása nélkül. Az így nyert egyedi transzgenikus növény teljesen mentes bármilyen az emberi testre kifejtett káros hatástól, amit a szelektálható marker gén okoz, ahogy azt korábban már említettük. Ezenkívül, ezen vektor használata nem igényli a sejt szaporodást gátló anyagok használatát, ami csökkentheti a sejt aktivitását a transzgenikus szövet szelektálási lépésében.

A jelen találmány vektora bármilyen növényben felhasználható, melybe géngensebészeti módszerekkel bejuttatható. A jelen találmánnyal összhangban a kívánt gén bármilyen olyan gén lehet, mellyel mezőgazdasági szempontból kiváló tulajdonság biztosítható és bármely gén mely lehetővé teszi a gén expressziós mechanizmus és más hasonló tanulmányozását, bár a mezőgazdasági szempontból kiváló tulajdonságok nem szükségképpen juttatódnak be.

Egy protein, például egy enzim génből való termeléséhez egy a struktúr gén polipeptid és szabályozó szekvenciáinak - például promóter szekvencia (expresszió iniciációs szekvencia), egy terminátor szekvencia (expresszió terminációs szekvencia) és más hasonló szekvenciák - információit kódoló struktúr gén szekvenciára van szükség. A növényben funkcionáló, megfelelő promóter szekvenciákra szolgáló példák közé tartoznak a karfiol mozaik vírus 35S promótere (J. T. Odell et al., nature (London), vol.313, p.810, 1985), egy nopalin szintetáz promótere (W. H. R. Langridge et al., Plant Cell Rep., vol.4, p.355, 1985) és a ribulóz difoszfát karboxiláz/oxigenáz kis alegység promótere (R. Fluher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, p. 2358, 1986). A megfelelő terminátor szekvenciákra szolgáló példák közé tartoznak egy nopalin szintetáz poliadenilációs jele (A. Depicker et al., J. Mol. Appl. Gen. vol.1, p.561, 1982) és egy oktopin szintetáz poliadenilációs jele (J. Gielen et al., EMBO J., vol.3, p.835, 1984). Ennek megfelelően, ha szükséges, a jelen találmány vektorán

levő gén egy struktúr gént és ennek gén expressziós szabályozó rendszerét tartalmazza. A gén vagy a gén és a szabályozó szekvenciák kémiai szintézissel vagy cDNS klónozással vagy genom DNS klónozással nyerhetők.

A jelen találmány vektora indirekt módon is bejuttatható a növényi sejtbe vírusok, vagy baktériumok segítségével, melyekkel a növényeket fertőzzük (I. Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., vol. 42, p. 205, 1991). A megfelelő vírusokra példák a karfiol mozaik vírus, a geminivírus, a dohány mozaik vírus és a rozsok mozaik vírus. A megfelelő baktériumokra példák az *Agrobacterium tumefaciens* (a későbbiekben *A. tumefaciens*-ként utalunk rá), az *Agrobacterium rhizogenes* (a későbbiekben *A. rhizogenes*-ként utalunk rá). Általában a kétszikű növényekről ismert, hogy az *Agrobacterium* nemzetségbe tartozó baktériumokkal fertőzik ezeket. Nemrégiben beszámoltak arról is, hogy egyszikű növényekbe géneket jutattak be ezen növények ezen génekkel való fertőzésével (például International Laid-Open No WO 94/00977).

A jelen találmány vektora közvetlenül is bejuttatható a növényi sejtbe fizikai és kémiai módszerek segítségével, például mikroinjektálással, elektroporációval, egy polietilén glikolos módszerrel, egy fúziós módszerrel és egy nagy sebességű ballisztikus penetrációval (I. Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. vol. 42, p. 205, 1991). Mivel az általános közvetett *Agrobacterium*ot használó bejuttatási módszer nem alkalmazható számos egyszikű növény esetében és az *Agrobacterium*mal végzett fertőzéssel szemben rezisztens kétszikű növények esetében a fent leírt közvetlen bejuttatási módszerek hatékonyak ezen növények esetében.

A jelen találmányhoz használható vektor nem különösebben korlátozott, amíg a jelen találmány követelményeit kielégíti. Például, ha a vektort közvetve juttatjuk be a növényi sejtbe, a vektor lehet egy Ti vektor vagy egy vírus vektor. A jelen találmányban való alkalmazáshoz a Ti vektorra példák a Bin19 (M. Bevan et al., Nucleic Acids res., vol. 12, p.

8771, 1984), a pRAL3940 plazmid (A. Hoekema et al., Plant Mol. Biol. vol. 5, p. 85, 1985), a pGA492 és a pGA482 plazmidok (G. An et al., Plant Physiol., vol. 81, p.86, 1986), a pL22 plazmid (C. Simoens et al., Nucleic Acids Res., vol. 14, p.8075, 1986), a pAGS111 (P. Van den Elzen et al., Plant Mol. Biol., p. 5, vol. 149, 1985), pEND4K (H.J. Klee et al., Bio/Technology, vol. 3, p. 637, 1985), a pGV831 plazmid (R. De Blaere et al., Nucleic Acids res., vol.13, p.4777, 1985) és a pMON200 plazmid (R.T. Fraley et al., Bio/technology, vol.3, p.629, 1985). A jelen találmányban alkalmazható vírus vektorokra példák a karfiol mozaik vírus vektor (N. Brisson et al., Nature (London), vol.310, p.511, 1984) a gemini vektor (R.J. Hayes et al., Nature (London), vol.334, p.179, 1988), a rozsnok mozaik vírus vektor (R. French et al., Science, vol. 231, p.1294, 1986), a dohány mozaik vírus vektor (N. Takamatsu et al., EMBO J., vol. 6, p. 307, 1987) és az agroinfekciós vektor (N. Grimsley et al., Nature (London), vol. 325, p. 177, 1987). Azonban a jelen találmányban használt vektorok nem korlátozódnak ezekre a vektorokra.

Ezenkívül, a jelen találmányban használt kívánt gén nincs különösebben korlátozva. Maga a kívánt gén természete nem kritikus fontosságú a jelen találmány szempontjából. A jelen találmányban való használathoz a kívánt gén magába foglalja a betegség rezisztencia géneket (például a *Bacillus thuringiensis* endotoxinnal szembeni gént, WO 92/20802) a herbicid rezisztencia géneket (mutáns acetolaktát szintetáz gén, WO 92/08794) a mag raktározó protein gént (például a glutelin gént, WO 93/18643) a zsírsav szintézises gént (például az acil-ACP tioészteráz gént, WO 92/20236) a sejtfal hidrolízises gént (például a poligalakturonidáz gént (D. Grierson et al., Nucl. Acids Res., vol. 14, p. 8595, 1986), az antocianin bioszintézises gént (például kalkon szintetáz gént (H. J. Reif et al., Mol. Gen. Genet., vol. 199, p. 208, 1985)), az etilén bioszintézises gént (például az ACC oxidáz gént (A. Slater et al., plant Mol. Biol. vol. 5, p. 137, 1985)), az aktív oxigén-tisztító rendszer gént (például a glutation reduktáz gént (S. Greer és R.N. perham, Biochemistry, vol. 25, p.2736,

1986)) és a lignin bioszintézises gént (például a fenilalanin ammónia-liáz gént, cinnamil alkohol dehidrogenáz gént, o-metil-transzferáz gént, cinnamát 4-hidroxiláz gént, 4-koumarát-CoA ligáz gént, cinnamoil CoA reduktáz gént (A.M. Boudet et al., New Phytol., vol. 129, p. 203, 1995)). Azonban a jelen találmányban való használathoz a kívánt gének nem korlátozódnak csupán ezekre a génekre.

Sőt a jelen találmányhoz való a gazda növény sincs különösebben korlátozva. A gazdanövényként használt egynyári növények közé tartoznak a dohány (*Tabacum*), a paradicsom (*Lycopersicum*) az édes burgonya (*Ipomoea*) a burgonya (*Solanum*), a répa (*Dacus*), a saláta (*Lactuca*), a karfiol (*Brassica*), a káposzta (*Brassica*), az olajmag repce (*Brassica*), a napraforgó (*Helianthus*), a cukorrépa (*Beta*), a spárga (*Asparagus*), a banán (*Musa*), a gyapot (*Gossypium*), a hídfü (*Arabidopsis*), a lucerna (*Medicago*), a borsó (*Pisum*), a szójabab (*Glycine*), rizs (*Oryza*), a kukorica (*Zea*), és a rozs (*Secale*). A gazdanövényként használt fás növények közé tartoznak a nyárfa (*Populus*), az eukaliptusz (*Eucalyptus*), az akác (*Acacia*) a körte (*Pyrus*), az alma (*Malus*), a szőlő (*Vitis*), a dió (*Juglans*), a szilva (*Prunus*), a rózsza (*Rosa*) és a tűlevelűek (*Picea*). Azonban a jelen találmányban használatos növények nem korlátozódnak ezen növényekre.

A jelen találmányban a MAI gén azért expresszáldódik, hogy a sejt belsejét fiziológiailag rendellenessé tegye. A fiziológiai rendellenességek közé tartozik a növényi növekedési hormonok növényi sejtben való termelése, ami azt eredményezi, hogy a MAI gént tartalmazó sejt proliferációja és differenciálódása zavarodott és különböző morfológiai rendellenességeket indukál. Például a rendellenes hajtások aggregálódása, az apikális dominancia megsemmisülésével (extrém módon hajtásos fenotípus, ESP), szőrös gyökerek és más hasonlóak származtathatók egy olyan sejtől, melybe a MAI gént bejuttattuk. Ez a fenotípus a fent említett sejt rendellenes proliferációjával és differenciálódásával jön létre. Így ez a morfológiailag rendellenes szövet csupán az ezen gént tartalmazó sejtekből épül fel.

Ennek megfelelően, a vektort szelektálható marker génként ezt a gént használva szerkesztjük meg a kívánt génnel együtt és bejuttatjuk egy növényi sejtbe, majd pedig a sejtet tenyésztjük, a csupán olyan sejtekből álló szövet, melyekbe a szelektálható marker gént és a kívánt gént bejutattuk, szelektálható csupán a növényi sejtéből képződött morfológiailag rendellenes szövet vizuális szelekciójával. Így lehetséges a transzgenikus növényeket vizuálisan szelektálni bármilyen speciális eljárások - mint például a növényi sejt növekedést gátló anyagok tápközeghez való hozzáadása - végrehajtása nélkül.

Míg a hagyományos szelektálható marker gének, mint például az NPTII gén nem juttathatók a növényekbe gensebészett nélkül, a jelen találmány MAI génje egy olyan gén, mely elválaszthatatlanul visszamarad, vagy mely természetes úton juttatható be a növényekbe baktériumos fertőzéssel vagy valami hasonló módon. Ezért meglehetősen magasnak tartják a gén termék emberi testtel szembeni biztonságát.

Továbbá, a jelen találmányban a MAI gént egy olyan pozícióban inzertáljuk, hogy elválaszthatatlanul együtt funkcionál az eltávolítható DNS elemmel. Ha egy ilyen szerkezetű vektort bejuttatunk a növénybe, a szelektálható marker génként használt MAI gén eltávozik a DNS-ből az eltávolítható DNS elemmel együtt adott gyakorisággal, ami a funkció elvesztéséhez vezet. Ezalatt a kívánt gént, mely nem az eltávolítható DNS elemmel együtt funkcionál visszamarad ugyanabban a DNS-ben és megtartja funkcióját. Így ugyanazon szelektálható marker gén expressziója használható egy kívánt gén bejuttatási indexeként újra és újra. Ennek megfelelően, ez a vektor a gén egy adott növénybe való többszörös bejuttatását eredményezi csupán a bejuttatandó kívánt génhez viszonyított szerkezet megváltoztatásával, anélkül, hogy bármilyen változást okoznánk a szelektálható marker gén és más gének szerkezetében. Ezért a vektor ismételten felhasználható korlátlan ideig.

Miután a szelektálható marker gén funkciójának elvesztése, azaz a MAI gén funkciójának elvesztése vizuálisan detektálható, a szelektálható marker gént nem tartalmazó



és a kívánt gént magába foglaló sejtekből álló szövet biztosan és könnyen nyerhető ki. Azaz, a tenyésztés, a vizuális szelekció és szeparáció megismételhető anélkül, hogy bármilyen speciális eljárást alkalmaznánk egy ilyen szövet kinyeréséhez. Továbbá, a csupán a fent említett sejtekből álló növény kinyerhető csupán a kinyert szövetből történő növény regeneráltatásával, anélkül, hogy keresztezési lépést alkalmaznánk. Ezenkívül, bár a transzpozont nehéz teljesen eltávolítani a DNS-ből, mivel ezen elemnek nagy a transzponálhatósága, a találmány megfelelően ültethető át a gyakorlatba, mivel a szelekció igen hatékony.

### Példák

A jelen találmányt a következő példákra való hivatkozással illusztráljuk, de a jelen találmány nem korlátozódik ezen példákra.

A következő példákban a kísérleteket a Molecular Cloning (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) 2. kiadása utasításainak megfelelően végezzük el vagy a gyártók útmutatásának megfelelően hacsak másként nem jelöltük.

### 1. példa

#### I. Egy vektor megszerkesztése

A patogén *A. tumefaciens* PO22-es törzs T-DNS-ében jelen levő ipt gént (H. Wabico, Chemical Regulation of Plants, vol.24, p.35, 1989 (lásd az 1. ábrát) a PstI restrikciós endonukleázzal kivágjuk és a pIPT1 plazmidot úgy nyerjük, hogy az ipt gént a pUC7 plazmid PstI restrikciós endonukleáz helyére ligáljuk (Molecular Cloning, 2. kiadás, 1. kötet 4.10.).

Ebből a plazmidból egy natív promótert és egy natív poliadenilációs jelet tartalmazó ipt gént kivágunk a BamHI és PstI restrikciós endonukleázokkal és a pIPT2 plazmidot (Takara Shuzo Co., Ltd-től szeretük be) az ipt gén pUC119 plazmid BamHI-PstI restrikciós endonukleáz helyeire való ligálásával nyerjük. Ebből a plazmidból a struktúr gént és az ipt gén natív poliadenilációs jelét az RsaI restrikciós endonukleázzal kivágjuk és a pIPT3 plazmidot az ipt gén a pUC119 plazmid SmaI restrikciós endonukleáz helyére való ligálással nyerjük. Ezenkívül, a pIPT3 plazmidba inzertált ipt gént a BamHI és SacI restrikciós endonukleázokkal kivágjuk és a pIPT4 plazmidot úgy nyerjük, hogy a fragmentet a pBI121 vektor plazmid (a Clontech Co.-től szeretük be) BamHI-SacI restrikciós endonukleáz helyére ligáljuk, mely egy növénybe való gén bejuttatáshoz használható. Ha egy növényt a pIPT4 plazmidot tartalmazó *A. tumefaciens* baktériummal fertőzzük, egy az LB hely és egy RB hely között létező T-DNS régió, itt egy körülbelül 5 kb hosszúságú régió, mely az NPTII gént és az ipt gént tartalmazza, integrálódik a növény kromoszómájába.

Ezt a pIPT4 plazmidot juttatjuk be az *E. coli* (*Escherichia coli*) JM109 törzsbe és a Budapesti Szerződésnek megfelelően *E. coli* JM109 (pIPT4) néven, FERM BP-5063 katalógusszámon deponáljuk.

A pIPT4 plazmid megszerkesztés stratégiájának sémáját a 2-4. ábrákon mutatjuk be. Ennek T-DNS régiója restrikciós endonukleáz térképét az 5. ábrán mutatjuk be. A 2-4 és 5. ábrákon a bekarikázott "P" és "T" sorrendben egy natív promótert és az ipt gén egy natív poliadenilációs jelét jelzi. A 25S-P a karfiol mozaik vírus egy 35S promóterét és a Nos-P egy nopalin szintetáz gén egy promóterét jelöli. A T (4. ábra) vagy a Nos-T (5. ábra) a nopalin szintetáz gén egy poliadenilációs jelét jelzi.

Ebben a példában amint azt az 5. ábrán is bemutatjuk, szelektálható marker génként a MAI génhez az ipt gént - mely hozzájárul egy ESP létrejöttéhez, az apikális dominancia megsemmisítésén keresztül - használjuk és az NPTII gént használjuk a kívánt gén

modelljeként. Az ipt gén az onkogének egy tagja, melyet a patogén *A. tumefaciens* megőriz. Egy növényi sejt, melybe ezt az ipt gént bejuttatjuk, olyan differenciálódást eredményez, mely egy ESP képződéséhez vezet, a citokinin túlermelésén keresztül, mely egy növényi hormon.

Ebben a példában a karfiol mozaik vírus 35S promóterét használjuk az ipt gén egy promóter szekvenciájához és az ipt gén natív poliadenilációs jelét használjuk terminációs szekvenciaként.

## II. A pIPT4 Agrobacteriumba való bejuttatása

Az *A. tumefaciens* LBA4404 törzsét (a Clontech Co.-\*tól szereztük be) inokuláljuk 10 ml-es YEB folyékony tápközegbe (5 g/l marhakivonatot, 1 g/l élesztőkivonatot, 1 g/l peptont, 5 g/l szacharózt, 2 mM MgSO<sub>4</sub>-et tartalmaz, pH értéke 7,2 22 C° hőmérsékleten, a pH-t 22 C° hőmérsékleten alakmazzuk hacsak másként nem jelöltük) és 28 C° hőmérsékleten tenyésztjük míg az OD<sub>630</sub> 0,4 - 0,6 értékek közé esik. Ekkor a tenyészetet 6900 x g értéken centrifugáljuk 10 percig 4 C° hőmérsékleten a sejtek összegyűjtése céljából. A sejteket 20 ml 10 mM Tris-HCl-ben (pH 8,0) szuszpendáljuk és a szuszpenziót 6900 x g értéken 10 peric újra centrifugáljuk 4 C° hőmérsékleten. Ezt követően, az összegyűjtött sejteket 200 µl YEB folyékony tápközegben reszuszpendáljuk és ezt a szuszpenziót használjuk sejt oldatként a plazmid bejuttatásához.

Egy 15-ml-es kémcsőben (Falcon) 200 µl a plazmid bejuttatásához való sejt oldatot keverünk össze 6 µg a fenti I-es lépésben nyert pIPT4 plazmiddal és a keveréket lehűtjük oly módon, hogy a kémcsövet 5 percre etanolba merítjük, melyet 30-40 percig folyékony nitrogénben hűtöttünk le. Az ily módon lehűtött oldatot a kémcsővel együtt állni hagyjuk 29 C° hőmérsékletű vízfürdőben 25 percen keresztül. Ezután 750 µl YEB folyékony tápközeget adunk hozzá és az összekevert oldatot 29 C° hőmérsékleten tenyésztjük 29 C° hőmérsékleten

1 órán keresztül, rázatás mellett. Ezt a sejt oldatot YEB agar tenyésztő tápközegre szélesztjük (1,2 w/v% agart és a fent említett tenyésztő tápközeg alkotórészeivel azonos összetétel) mely 50 mg/liter kanamicint is tartalmaz, majd 28 °C hőmérsékleten tenyésztjük 2 napon keresztül. Az így nyert sejt telepeket YEB folyékony tápközegbe oltjuk és tovább tenyésztjük. Ezután a plazmidot kivonjuk a sejtekből egy alkáli módszert használva és a PstI, BamHI és EcoRI restriktációs endonukleázokat használva hasítjuk. A plazmid így nyert fragmentjeit agaróz gél elektroforézissel analizáljuk és megerősítjük, hogy a pIPT4 plazmidot bejuttattuk az *A. tumefaciens* LBA4404 törzsébe.

### III. Az Agrobacteriumból származó pIPT4 plazmid dohányba való bejuttatása

Üvegházban nevelt érett dohány leveleket (*Nicotiana tabacum* cv. *xanthi* a későbbiekben a dohány megnevezés alatt ezt a változatot értjük, hacsak másként nem jelezzük) 1 v/v% nátrium hipoklorit vizes oldatába merítjük sterilizálás céljából, majd steril vízzel mossuk háromszor. Eután a levél középső érét eltávolítjuk a körülbelül 8 mm<sup>2</sup> területű levél korongokból. Az így kapott levél korongokat körülbelül 1 percre *A. tumefaciens* LBA4404 törzs - mely a fent leírt II lépésben előállított pIPT4 plazmidot tartalmazza - szuszpenziójába merítjük, és azzal megfertőzzük (ezt a szuszpenziót steril vízzel hígítjuk OD<sub>630</sub>=0,25 értékre, az egy éjszakai YEB folyékony tápközegben való szaporítás után). A fertőzött levél korongokat egy steril szűrőpapírra helyezük a felesleges sejt szuszpenzió eltávolítása céljából. Ezután, hormon mentes MS agar tápközegre helyezük (T. Murashige and F. Skoog, *Physiol. Plant.*, vol.15, p. 473, 1962 (0,8 w/v% agart adunk hozzá)), mely 50 mg/liter acetosziringont tartalmaz, a levelek háta felfelé néz, az inkubálást három napig

végezzük 25 C° hőmérsékleten, teljes megvilágításban (az explantum, egy növényi szövet és egy növény tenyésztését ezen a hőmérsékleten és ilyen megvilágításban végezzük, hacsak másként nem jelöltük). Az így tenyésztett levél korongokat ezután egy hormon mentes MS agar tápközegre helyezünk, mely csupán 500 mg/liter carbencillint tartalmaz és a tenyésztést folytatjuk. Ennek eredményeként 22 mellék hajtás redifferenciálódik. Ezeket a mellékajtásokat elkülönítjük és tovább tenyésztjük a fent leírtakat tartalmazó tápközegben 6 ESP vonal nyérése céljából. Ezeket az ESP vonalakat havonta ugyanabba a tápközegbe helyezzük és hormon mentes, arbenicillint nem tartalmazó MS agaron is áthelyezzük több alkalommal a fetőzést követő 3 hónap során. Ha az *Agrobacterium* proliferációját már nem észleljük, egy kanamicin rezisztencia tesztet és egy PCR analízist végzünk el.

#### IV. A dohány analízise, melybe a gént bejuttattuk.

##### A. Kanamicin rezisztencia teszt

A fent leírt III-as lépés szerint nyert 6 ESP vonalat úgy tenyésztjük, mint a szubkultura nélkül. Az ezen ESP vonalokból fejlődött leveleket kivágjuk, körülbelül 3 mm<sup>2</sup> területű levél korongok létrehozása céljából. Az így kapott levél korongokat 200 mg/liter kanamicint tartalmazó MS agar tápközegre (1 mg/liter benzil adenint és 0,2 mg/liter alfa-naftalén esetsavat adunk hozzá) helyezzük. Ebben a kanamicint tartalmazó tenyész tápközegben való 1 hónapig tartó tenyésztés után az ESP vonalak képződését megfigyeljük az ezen ESP vonalokból nyert levél korongokon.

##### B. PCR analízis

A fent leírt III-as lépésben nyert 6 ESP vonal kromoszóma DNS-ét extraháljuk és a bejuttatott géneket PCR módszerrel analizáljuk.

A kromoszóma DNS-t a következő módosított CTAB módszert használva extraháljuk.

Először, körülbelül 1 g ESP-ből fejlődött levelet megőrünk folyékony nitrogénben egy hűtött mozsár és mozsártörő segítségével, majd 5 ml, 60 C° hőmérsékletűre hevített pufferben (2 w/v% CTAB (hexadecil-trimetil-ammónium bromid), 1,4-M NaCl, 0,2 v/v% béta-merkaptotanol, 20 mM EDTA és 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)) szuszpendáljuk. Ezt a szuszpenziót 30-60 percig 60 C° hőmérsékleten hevítjük óvatos rázatás mellett, majd szobahőmérsékletűre hűtjük. Ehhez a szuszpenzióhoz kloroform és izoamil alkohol (24:1) keverékét adjuk azonos térfogatban és ezt keverjük óvatosan. Ezután a keveréket centrifugáljuk 1600 x g értéken 5 percen keresztül a felülúszó eltávolítása céljából. Ezt követően, 2/3 térfogat izopropil alkoholt adunk a felülúszóhoz és újra óvatosan keverjük. A keveréket 10 percig hagyjuk jégen állni, a kromoszómális DNS kicsapódása céljából. Ezt a kromoszómális DNS-t 1600 x g értéken 10 percig végzett centrifugálással gyűjtjük össze. Az így összegyűjtött kromoszómális DNS-t 70 v/v% etanolban mossuk, vákuum szárítjuk és 300 µl TE-ben (10 mM Tris-HCl és 1 mM EDTA) feloldjuk.

Ezalatt az ipt gén PCR módszerrel való detektálásához egy sor használandó primert (oligonukleotid) szintetizálunk egy DNS szintetizáló (Applied Biosystems Co.) segítségével. Amikor ezek az ipt génhez kötődnek a két primer közötti távolság körülbelül 800 bp lesz. Az ipt gén amplifikálásához 1 µg extrahált kromoszómális DNS-t oldunk fel 50 µl 0,2 µM primer, 10 mM tris-HCl (pH 8,8 25 C° hőmérsékleten), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 w/v% Triton X-100, 0,1 mM dNTP és 1,25 egység Taq polimeráz (CETUS CO) elegyében. Miután az elegyet 94 C° hőmérsékletűre hevítettük 1,5 perc alatt, egy három részes hevítési ciklust ismételünk - nevezetesen 94 C° hőmérséklet 1 perc, 55 C° hőmérséklet 2 pec és 72 C°

hőmérséklet 3 perc - összesen 30 percig a reakció végrehajtásához. A kapott reakció keveréket agaróz gél elektroforézissel analizáljuk az ipt gén kromoszómális DNS-ben való jelenlétére a körülbelül 800 bp hosszúságú gén amplifikációjának segítségével.

Az eredményeket a 6. ábra mutatja be. Amint az a 6. ábrából is látható a körülbelül 800 bp hosszúságú gén amplifikációját mind a 6 ESP esetében megfigyeltük. A 6. ábrán a bal oldalon bemutatott értékek a bázisok hosszát jelzik, melyet sáv alkotóval detektálunk (ezután “sáv”-ként utalunk rá) a DNS méret marker elektroforézise során.

### Összehasonlító 1. példa

Az analízist 16 hajtás esetében végezzük el, mely hajtások nem képesek ESP-t létrehozni és melyeket az 1. példa III-as lépésében az *A. tumefaciens*-szel fertőzött levélből újradiiferenciálódott mellék hajtásokból nyerünk. Azaz azonos időben 22 mellék hajtást tenyésztünk és a 6 ESP vonalat az 1. példa III-as lépésében szelektáljuk, azok, melyek morfológiailag normális hajtásnak néznek ki (a továbbiakban “nem-ESP”-ként utalunk rá) szintén *A. tumefaciens* mentessé tesszük és kanamicin rezisztencia vizsgálatnak vetjük alá az 1. példa III-as és IV-es lépéseiben leírtakkal azonos módon. Ezenkívül, a 9 nem-ESP vonalat PCR analízisnek vetjük alá. Azonban ezen nem-ESP vonalak tekintetében a kanamicint tartalmazó tenyész tápközegre helyezett levél korongok mind megbarnultak és 3 hónap után elhervadtak. Ezenkívül, a PCR analízis során a körülbelül 800 bp hosszúságú DNS fragment amolifikációja - mely az ipt gén jelenlétét bizonyítja - nem detektáltuk a kilenc vizsgált vonal egyikében sem.

A PCR analízis eredményeit a 6. ábrán mutatjuk be.

## 2. példa

### I. Egy vektor megszerkesztése

A pHSG398 plazmidot (Takara Shuzo Co., Ltd.) a BamHI restrikciós endonukleázzal emésztjük. Az emésztéssel létrehozott kohéziós végeket tompa végűvé tesszük T4 DNS polimeráz I-gyel (nagy alegység) és a pNPI100 plazmidot ezen terminusok ligálásával nyerjük. Azaz a pNPI100 plazmid a pHSG398 plazmid, mely elvesztette a BamHI restrikciós endonukleáz helyet. Míg a pCKR97 plazmidot (T. Izawa et al., Mol. Gen. Genet., vol. 227, p.391, 1991) a PstI restrikciós endonukleázzal emésztjük. A kukorica Ac transzpozonját kivágjuk és a pNPI100 plazmid PstI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk a pNPI102 plazmid létrehozása céljából.

Ezután az 1. példában megszerkesztett pIPT4 plazmidból egy karfiol mozaik vírus 35S promótert és a hozzá kapcsolódó ipt gént kivágjuk a HindIII és SacI restrikciós endonukleázokkal. Az így nyert fragment kohéziós végeit tompa végűvé alakítjuk T4 DNS polimeráz I-et használva és a fragmentet a pUC119 plazmid HincII restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk a pNPI101 plazmid létrehozása céljából. Ebből a pNPI101 plazmidból ismét kivágjuk a karfiol mozaik vírus 35S promótert és az ipt gént a PstI és EcoRI restrikciós endonukleázok segítségével és a fragment kohéziós végeit tompa végűvé alakítjuk T4 DNS polimeráz I-et használva. Ezután, a pNPI103 plazmidot hozzuk létre úgy, hogy a fragmentet a pNPI102 plazmid tompa végű BamHI restrikciós endonukleáz helyére ligáljuk. Azaz a pNPI103 plazmidban a 35S promóter és a hozzá kapcsolódó ipt gént a régi BamHI restrikciós endonukleázban vágjuk ki az Ac transzpozonon belül.



A kívánt gént úgy kapjuk meg, hogy kivágjuk a karfiol mozaik vírus 35S promótert és az ipt gént tartalmazó Ac transzpozont a pNPI103 plazmidból a PstI restrikciós endonukleáz segítségével és ezt az Ac transzpozont inzertáljuk a pBI121 vektor plazmid SseI restrikciós endonukleáz helyére. Ezt pNPI106 plazmidnak jelöljük.

Ezt a pNPI106 plazmidot szintén bejuttatjuk az *E. coli* JM109 törzsbe és a Budapesti Szerződés szerint deponáljuk *E. coli* JM109 (pNPI106) törzsként FERM BP-5064 katalógusszámon.

A pNPI106 plazmid megszerkesztésének stratégiáját sematikusán a 7-9. ábrában mutatjuk be. Ennek T-DNS régió restrikciós endonukleáz térképét a 10. ábrán mutatjuk. A 7-9 és 10. ábrán az Ac transzpozon terminális régióját fordított fekete háromszögekként jelöljük. A 10. ábrán az Ac-P egy az Ac transzpozonon belüli natív promótert képvisel. A többi jelölés ugyanaz, mint amiket a 2-5 ábrákon használtunk.

Amint az a 10. ábrán látható ez a plazmid szelektálható marker génként az ipt génnel rendelkezik és az NPTII gén és GUS (béta-galaktozidáz) gén a T-DNS régióban levő kívánt gén modelljeként szolgál, nevezetesen, a növény kromoszómájába integrálandó régióban. Ezenkívül, az ipt gén az Ac transzpozonon belüli inzetációként van jelen. Miután a GUS gént tartalmazó sejtek egy speciális szusztrátot alakítanak át egy kék pigment termeléséhez a gén expressziója ezen pigment detektálásán keresztül azonosítható. Így a GUS gént gyakran használják a gén növényben való expressziójának analíziséhez.

## II. A pNPI106 plazmid dohányba való bejuttatása és azon dohány analízise, melybe a gént bejuttattuk

### A. A pNPI106 plazmid dohányba való bejuttatása és a bejuttatott gén expressziójának tesztelése

Az 1. példa II-es és III-as lépéséhez hasonló módon a pNPI106 plazmidot bejuttatjuk az *A. tumefaciens* LBA4404 törzsébe és a dohány levél korongokat ezzel az *A. tumefaciens*-szel fertőzzük. Az így megfertőzött dohány leveleket hormon mentes, 50 mg/liter acetosziringont tartalmazó MS agar tenyész tápközegben tenyésztjük, majd hormon mentes MS agar tenyész tápközegre helyezük, mely 500 mg/liter carbenicillint tartalmaz. Két hónapig tartó tenyésztés után 63 ESP vonalat különítünk el.

Ezeket az ESP vonalakat ugyanilyen összetételű tenyész tápközegre (hormon mentes MS agar tenyész tápközeg 500 mg/liter carbenicillinnel) helyezük. Egy hónappal később az enyhén fejlődött ESP-k hajtásai közül 9 hajtást (azokat, melyek az ESP-kból jöttek létre a továbbiakban egyszerűen "hajtás"ként szerepelnek) vizuálisan válogatjuk ki, melyek körülbelül kétszer vagy háromszor olyan gyorsan fejlődtek a többi hajtáshoz képest, melyekben az oldal hajtások fejlődését nem figyeltük meg, és melyekben az ipt gén hatása úgy tűnik csökkent. Ezen hajtások leveleit az 1. példa IV-A lépésében végrehajtottal azonos kanamicin rezisztencia tesztnek vetjük alá és a GUS gén expressziójának tesztjét (GUS aktivitási teszt) Jefferson et al módszere alapján végezzük el. A levelek levágása után a kapott hajtásokat hormon mentes MS agar tenyész tápközegre helyezük és tenyésztjük. Egy hónappal később megfigyeljük, hogy a hajtások képesek-e ESP-ket létrehozni, és így az ipt gént expresszálni.

Az eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

A pNPI106 vektor plazmidaal dohányba bejuttatott gén expresszió tesztjének eredményei

|              | Hajtás szám | Kanamicin rezisztencia | GUS aktivitás | Morfológia 1 hónap tenyésztés után |
|--------------|-------------|------------------------|---------------|------------------------------------|
| 2. példa     | 1           | +                      | +             | ESP                                |
| 2. példa     | 2           | +                      | +             | ESP                                |
| 2. példa     | 3           | +                      | -             | ESP                                |
| 2. példa     | 4           | +                      | +             | ESP                                |
| 2. példa     | 5           | +                      | -             | ESP                                |
| 2. példa     | 6           | +                      | -             | ESP                                |
| 2. példa     | 7           | +                      | +             | ESP                                |
| 2. példa     | 8           | +                      | +             | normális                           |
| 2. példa     | 9           | +                      | +             | ESP                                |
|              |             |                        |               |                                    |
| Öh. 2. példa | 10          | -                      | -             | normális                           |
| Öh. 2. példa | 11          | -                      | -             | normális                           |
| Öh. 2. példa | 12          | -                      | -             | normális                           |

Megjegyzés 1. A kanamicin rezisztenciában + a “rezisztens” és - a “nem rezisztens”

2. A GUS aktivitásban + az “aktív” és - az “inaktív”.

3. A “normális” egy olyan egyed jelöl, mely domináns növekedést okoz az apikális hajtásnál valamint gyökerek képződését

Amint az az 1. táblázatból egyértelmű, bár a 8-as számú hajtás levelei rendelkeznek kanamicin rezisztenciával és GUS aktivitással ESP nem képződik még akkor sem, ha a hajtást 1 hónapig tenyésztjük. Ez feltehetően annak köszönhető, hogy az ipt gén, mely az ESP képződését idézi elő jelen van az inzertált formában az Ac transzpozonon belül a pNPI106 plazmidban. Azaz az ipt gén, melyet a dohány kromoszómájába bejuttattuk, a szövet plazmidot tartalmazó *A. tumefaciens*-szel való fertőzésével a szövet tenyésztés kezdeti lépésekor expresszáldik közvetlenül a fertőzés után, az Ac transzpozonnal együtt eltávozik az Ac hatása következtében a későbbi tenyésztés során. Ezalatt ugyanebben a vektorban az NPTII gén és a GUS gén oly módon pozicionálódik, hogy nem hatnak együtt az Ac transzpozonnal így ezek a gének a növény kromoszómájában maradnak és expresszáldnak.

Az 1. táblázatban bár a kanamicin rezisztencia és az ESP képződési képességet megfigyeltük a 3-as, 5-ös és 6-os számú hajtások esetében is csupán a GUS aktivitás negatív. Ez azt jelenti, hogy ezekben a hajtásokban a pNPI106 plazmid segítségével bejuttatott gének közül csupán a GUS gén nem expresszáldik. Úgy véljük, ez a hibás integrációnak köszönhető, mely akkor következik be amikor ezeket a géneket olyan növény kromoszómájába építjük be, mely tartalmazza a pNPI106 vagy hasonló plazmidok szerkezetét. Azaz, ha a gént az *Agrobacterium tumefaciens*-szel - a T-DNS régió - keresztül juttatjuk be nevezetesen az RB és az LB hely közötti teljes belső régió normálisan kell integrálódjon a növény kromoszómájába. Azonban ez a régió néha nem integrálódik teljesen, hanem elszakad és az LB terminusok bizonyos részeit nem tartalmazó hiányos darabok inzertálódnak. A pNPI106 plazmid T-DNS régiójában a GUS gén az LB helyhez a legközelebb helyezkedik el. Ennek megfelelően, úgy véljük, hogy a gén bejuttatás során a hibás integráció következtében a GUS gén a kromoszómába olyan körülmények között integrálódik, hogy a GUS gén darabokra szakad és elveszíti funkcióját vagy nem a teljes GUS

gén inzertálódik, így a GUS gén nem expresszálódik ezekben a hajtásokban és aktivitása nem figyelhető meg.

A 2-es és 8-as számú hajtás fényképe egy hónapos tenyésztés után a 11. és 12. ábrán látható.

A 8-as számú hajtásból fejlődött leveleket, valamint a kanamicin rezisztencia tesztet elvégezve tekintve a tenyésztést a teszt után tovább folytatjuk. Öt további hajtást nyerünk ebből a levélből és ezek mindegyike nem-ESP.

#### B. PCR analízis

Az 1-es - 9-es számú hajtásokon (1. táblázat) miután az ESP képzési képességet megfigyeltük, PCR analízist hajtunk végre az 1. példa IV-B lépésének megfelelő módon. az ipt gén kromoszómában való jelenlétének további vizsgálata céljából, feltételezve, hogy az NPTII génhez és a GUS génhez kapcsolandó tervezett primerket is felhasználjuk az 1. példa IV-B lépésében használt primereken felül. Abban az esetben ha ezeket a primerket használjuk, ha az ebbe inzertált Ac transzpozont és az ipt gént (Ac-ipt gén komplex) kimetszük a pNPI106 plazmid T-DNS régiójából egy körülbelül 3 kb hosszúságú DNS fragmentet amplifikálunk a PCR során. Ennek megfelelően, az Ac-ipt gén komplex DNS-ből való kimetszése detektálható indexként ezt az amplifikációt használva.

A 8-as hajtás PCR analízisének eredményeit a 13. ábrán mutatjuk be, ahol a bal oldalon mutatott értékek ugyanazok, mint a 6. ábrán bemutatottak.

Amint az az eredményekből is egyértelmű a 8-as hajtásból extrahált kromoszómális DNS-ben a körülbelül 3 kb hosszúságú DNS fragment - mely az Ac-ipt gén komplex kimetszését biztosítja - amplifikációja megfigyelhető, míg a körülbelül 800 bp hosszúságú DNS - ami az ipt gén jelenlétét biztosítja - amplifikációja nem figyelehtő meg. Ez azt jelenti,

hogy az ipt gént kimetsszük ezen hajtás kromoszómális DNS-éből az Ac transzpozonnal együtt és ezek eltűnnek.

Másrészt az 1-es - 7-es és 9-es hajtásokat tekintve a körülbelül 3 kb hosszúságú DNS fragment amplifikációját nem észleljük egyik kromoszómális DNS mintában sem, míg a körülbelül 800 bp hosszúságú DNS fragment amplifikációját minden kromoszómális DNS mintában észleljük. Ennek megfelelően, úgy véljük, hogy ezekben a hajtásokban az ipt gén még mindig jelen van a kromoszómális DNS-ben az Ac transzpozonnal együtt.

### Összehasonlító 2. példa

A 2. példa II-A lépésében az *A. tumefaciens*-szel fertőzött levelek tenyésztésekor az ESP-kel együtt redifferenciálódó 3 nem ESP-t elkülönítjük és kanamicin rezisztencia tesztnek és GUS aktivitási vizsgálatnak, vizuális megfigyelésnek - egy hónapos tenyésztés után - és PCR analízisnek vetjük alá a 2. példa II. lépésében leírtaknak megfelelően.

Az eredményeket az 1. táblázatban mutatjuk be. Az ezen nem-ESP-kból nyert hajtások nem rendelkeznek kanamicin rezisztenciával, GUS aktivitással és ESP képző képességgel. Ezenkívül, a körülbelül 800 bp és a körülbelül 3 kb hosszúságú DNS fragment amplifikációját nem detektáljuk a PCR analízis során.

### 3. példa

Ezenkívül a 2. példában szelektált 63 ESP vonal tenyésztését hormon mentes MS agar tenyésztápközegeben tovább folytatjuk. Ennek megfelelően, az elkülönítés után két hónappal összesen hét hajtást, a 13-1-es - 13-3-as és a 14-1-es - 14-4-es számú hajtásokat, melyek vizuálisan azonosítható normális hajtások, azaz melyek apikális dominanciát mutatnak,

nyerjük a 2 ESP vonalból. Ezeket a hajtásokat elkülönítjük a fent említett összetételű tenyésztápközegbe való átültetés céljából és ezek normálisan növekednek és gyökereznek. Ezek közül, a 13-1 és 14-1 számú egyedeket PCR analízisnek vetjük alá a 2. példa II-B lépésben leírtaknak megfelelő módon. Eredményként a körülbelül 800 bp hosszúságú DNS fragment amplifikációját egyik hajtás (13-1 és 14-1) esetén sem figyeljük meg. Ugyanakkor a körülbelül 3 kb hosszúságú DNS fragment amplifikációját mind a két hajtás esetén megfigyeljük. Azt határoztuk meg, hogy az ipt gént kimetszettük ezen egyedek kromoszómális DNS-éből az Ac transzpozonnal együtt és el is tűntek. Az eredményeket a 14. ábrán mutatjuk be, ahol a bal oldalon bemutatott jelek ugyanazok, mint a 6. ábrán bemutatottak. Ezenkívül, a GUS gén expresszióját mind a hét hajtásból nyert egyed esetében detektáltuk.

A 15. ábra az ESP-ből való normális hajtás differenciálódást mutatja.

#### 4. példa

Az 1. táblázatban a 2. példában 9 hajtásból szelektált 7-es számú hajtásként bemutatott hajtásból nyert levelet hormon mentes MS agar tenyész tápközegen tenyésztjük körülbelül 1 hónapig. Egy normális hajtást szelektálunk vizuálisan és különítünk el a tenyésztett levélből redifferenciálódott 6 mellék hajtás közül. Ezt a normális hajtást a fent leírt összetételű tenyész tápközegbe ültetjük, majd egy normális fejlődésű és meggyökerezett egyedot nyerünk. Ezenkívül, ezt az egyedot PCR analízisnek vetjük alá a 2. példa II-B lépésében leírtaknak megfelelően és a körülbelül 800 bp hosszúságú DNS fragment eltűnésére, valamint a körülbelül 3 kb hosszúságú DNS fragment amplifikációjára alapozva azt határoztuk meg, hogy az ipt gént kimetszettük a kromoszómális DNS-ből az Ac-vel együtt és el is tűnt. Az

eredményeket a 16. ábrán mutatjuk be, ahol a bal oldali jelek ugyanazok mint a 6. ábrán bemutatottak. Ezenkívül ugyanezekben az egyedekben észleltük a GUS gén expresszióját is.

## 5. ábra

### I. Az élesztőgombából származó hely-specifikus rekombinációs rendszer (pSR1 rendszer)

#### szeparálása

Élesztőgombát (*Zygosaccharomyces rouxii* (az Institute for Fermentation-től szereztük be) inokulálunk 5 ml YPAD folyékony tenyész tápközegebe (10 g/liter élesztőkivonat, 20 g/liter polipepton, 0,4 g/liter adenin és 20 g/liter glükóz) és 24 órán keresztül 30 C° hőmérsékleten tenyésztjük. A tenyész oldatot 6900 x g értéken 3 percig centrifugáljuk 20 C° hőmérsékleten a sejtek összegyűjtése céljából (a továbbiakban a sejteket ugyanilyen körülmények között gyűjtjük össze). Az összegyűjtött sejteket 2 ml 0,2 M Tris-HCl-t (pH 8,0) és 5 v/v% merkaptotetanolt tartalmazó oldatban szuszpendáljuk. A sejt szuszpenziót 25 C° hőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk óvatos keverés mellett, majd a sejteket összegyűjtjük. A továbbiakban az összegyűjtött sejteket 1 ml oldatban (2,5 mg/ml Zaimolyeis-20T (SEIKAGAKU CORPORATION), 10 w/v% szorbit és 5 w/v% KPO<sub>4</sub>) szuszpendáljuk. A szuszpenziót 30 C° hőmérsékleten 90 percig állni hagyjuk és újra centrifugáljuk a sejtek ismételt összegyűjtése céljából. Az összegyűjtött sejteket 1 ml 0,2 M NaCl-t, 0,1 M EDTA-t, 5 w/v% SDS-t, 50 mM Tris-HCl-t (pH 8,5) tartalmazó oldatban reszuszpendáljuk és 20 Proteináz K-t adunk hozzá 20 mg/ml koncentráció elérése céljából. Az összekevert oldatot 60 C° hőmérsékleten állni hagyjuk 1 órán keresztül majd újból szobahőmérsékletre helyezzük és fenol és kloroform elegyével extraháljuk, majd kloroformmal tisztítjuk. Az így nyert felülúszóhoz azonos térfogatú izopropanolt adunk a kromoszómális DNS és a pSR1 plazmid



kicsapátása céljából. A keveréket 6900 x g értéken 10 percig centrifugáljuk 4 C° hőmérsékleten a DNS összegyűjtése céljából és az összegyűjtött DNS-t 70 v/v% etanolban mossuk, majd vákuum szárítjuk és 100 µl TE-ben feloldjuk.

Templátként az így nyert DNS-t (a kromoszómális DNS és a pSR1 plazmid keveréke) használva csupán egy hely-specifikus rekombinációs rendszert amplifikálunk a PCR módszerrel, mely a pSR1 plazmidban van jelen (a továbbiakban “pSR1 rendszerként” utalunk rá). A pSR1 rendszer egy R gént tartalmaz, mely egy rekombinációs gén, valamint az Rs rekombinációs szekvenciát és ezek DNS szekvenciáját meghatározzuk (H. Araki et al., J. Mol. Biol., vol 182, p.191, 1985). A jelen találmányban az R gén amplifikálásához egy primert - melyben egy XbaI restrikciós endonukleáz helyet adtunk a 22 bázis 5'-pozíciójához, nevezetesen az 5596 - 5617 bázisokhoz a pSR1 plazmid (5'-CCTCTAGAATGCAATTGACCAAGGATACTG-3') szekvenciájában - valamint egy másik primert - melyben a SacI restrikciós endonukleáz helyet adtuk a 22 bázis 5' pozíciójához, nevezetesen a 4126 - 4147 bázisokhoz a pSR1 (5'-CCGAGCTCTTAATCTTGTCAGGAGGTGTCA-3') - szintetizálunk. Másrészt az Rs amplifikációjához 30 bázist tartalmazó pár primert (mindegyik mind a négy típust tartalmazza) szintetizálunk a használatához. Azaz, az egyik pár egy olyan primerből áll, melyben a pSR1 plazmid szekvenciája 287-316 bázisai közül hármat helyettesítünk és az SseI restrikciós endonukleáz helyet bejuttatjuk (5'-AGGATTGAGCTACTGGACGGGAATCCTGCA-3') és egy primert, melyben a pSR1 plazmid szekvenciája 690 - 719 bázisai közül négyet helyettesítünk és a HindIII restrikciós endonukleáz helyet és a XhoI restrikciós endonukleáz helyet bejuttatjuk (5'-CAACTCGAGCAATCAAAGCTTCTCGTAGTC-3'). Az ezen primer sorozattal amplifikálendő Rs-t “Rs1”-nek nevezzük. A másik pár egy olyan primerből áll, melyben a pSR1 plazmid szekvenciája 287-316 bázisai közül hármat helyettesítünk és egy XhoI

restrikciós endonukleáz helyet és egy EzoRI restrikciós endonukleáz helyet bejuttatunk (5'-AGGATTGAGCTACTCGAGGGGAATTCTGGA-3') és egy primert, melyben a pSR1 plazmid szekvenciája 688-717 bázisai közül ötöt helyettesítünk és a SseI restrikciós endonukleáz helyet bejuttatjuk (5'-ACTGGACCAATCCCTGCAGGTCGTAGTCAA -3'). Az ezen primer sorozattal amplifikálendő Rs-t "Rs2"-nek nevezzük.

Az R gén és az Rs-ek amplifikálása céljából az extrahált DNS oldat 1 µl mennyiségét hozzáadjuk az 1. példa IV-B lépésében használt kevert oldat 50 µl mennyiségéhez, mely 0,2 µM primer sorozatot tartalmaz. A három részes hevítési ciklust, nevezetesen 95 C° hőmérsékleten 30 másodperc, 55 C° hőmérséklet 30 másodperc és 72 C° hőmérséklet 1,5 perc, összesen 30-szor ismétljük meg a keverékkel. Az így nyert reakció elegyet analizáljuk agaróz gél elektrolízissel az R gén és az RS-ek amplifikációjának megerősítése céljából.

## II. Egy vektor megszerkesztése

A PCR módszerrel amplifikált Rs1-et PstI és XhoI restrikciós endonukleázokkal emésztjük és a pNPI126 plazmidot úgy nyerjük, hogy ezt az Rs1-et a pSL1180 plazmid (a Pharmacia Biotech Co.-tól szereztük be) PstI-XhoI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk.

Ezt követően, a pHSG398 plazmid EcoRI restrikciós endonukleáz helyének és HindIII restrikciós endonukleáz helyének eltávolítása céljából egymás után emésztjük ezeket a restrikciós endonukleázokat, az emésztett végeket tompa végűekké változtatjuk T4 polimeráz I-et (nagy alegység) használva és a tompa végű terminusokat ligáljuk. Így módon, az ezen restrikciós endonukleáz helyeket nem tartalmazó pNPI121 plazmidot nyerjük. A pNPI127

plazmidot úgy nyerjük, hogy a PCR módszerben nyert Rs2-öt XhoI és PstI restrikciós endonukleázokkal emésztjük és ezt az Rs2-öt a pNPI121 plazmid SalI-PstI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk.

A pNPI128 plazmidot úgy nyerjük, hogy a pNPI126 plazmidból az Rsl-et kivágjuk a SmaI és SpeI restrikciós endonukleázokkal és ezt a fragmentet a pNPI127 plazmid SmaI-XnaI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk.

A PCR módszerrel amplifikált R gént XbaI és SacI restrikciós endonukleázokkal emésztjük és a pHSG plazmid XbaI-SacI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk. Az így nyert plazmidot pNPI124-nek jelöljük.

Ezután a pBI221 plazmidot (Clontech Co.) a PstI restrikciós endonukleázzal emésztjük. Az emésztett terminust tompa végűvé tesszük, majd a fent leírt módon ligáljuk. Így az SseI és PstI restrikciós endonukleáz helyekkel nem rendelkező pNPI111 plazmidot nyerjük. Ezután az R gént kivágjuk a pNPI124 plazmidból XbaI és SacI restrikciós endonukleáz enzimeket használva és a pNPI111 plazmid XbaI-SacI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk a GUS gén helyettesítése céljából a pNPI125 plazmid létrehozására. Ezután egy karfiol mozaik vírus 35S promótert, a promóterhez kapcsolt R gént és a nopalin szintetáz poliadenilációs jelét kivágjuk a HindIII és EcoRI restrikciós endonukleázokkal és a pNPI128 plazmid HindIII-EcoRI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk a pNPI129 plazmid nyerése céljából.

A pNPI101 plazmidot SmaI restrikciós endonukleázzal emésztjük és egy 5'-foszforilált HindIII kötőt (Takara Shuzo Co., Ltd) inzertálunk az emésztési helyre a pNPI122 plazmid előállítására céljából. Azaz, ez a pNPI122 plazmid egy olyan plazmid, melyben a pNPI101 plazmid SmaI restrikciós endonukleáz helyét HindIII restrikciós endonukleáz helyel helyettesítünk. Ezenkívül, a pNPI122 plazmidot PstI restrikciós endonukleázzal emésztjük és az emésztett végeket tompa végűvé változtatjuk és ligáljuk az SseI és PstI restrikciós

endonukleáz helyeket nem tartalmazó pNPI123 plazmid létrehozása céljából. Ebből a pNPI123 plazmidból egy karfiol mozaik vírus 35S promótert és egy a promóterhez kapcsolódó ipt gént vágunk ki a HindIII restrikciós endonukleázzal és a pNPI129 plazmid HindIII restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk a pNPI130 plazmid létrehozása céljából.

A kívánt vektort úgy kapjuk meg, hogy az ipt gént, az R gént, és a hozzájuk kötődő karfiol mozaik vírus 35S promótert és ezen gének mindkét terminusán jelen levő Rs-eket tartalmazó fragmentet a PstI restrikciós endonukleázzal kivágjuk és a pBI121 plazmid SseI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk. Ezt a plazmidot nevezzük pNPI132 plazmidnak.

Ezt a pNPI132 plazmidot bejuttatjuk az *E. coli* JM109 törzsbe és a Budapesti Szerződésnek megfelelően *E. coli* JM109-ként deponáljuk FERM BP-4065 katalógusszámon.

A pNPI132 plazmid megszerkesztéséhez való stratégiát sematikusan a 17-19. ábrán mutatjuk be. Ennek T-DNS régiója restrikciós endonukleáz térképét a 20. ábrán mutatjuk be. A 17 - 19 és 20. ábrákon a vágott háromszögek az élesztőgomba pSR1 plazmidból származó Rs rekombinációs szekvenciát és ezen szekvencia irányát mutatják. A többi jel ugyanaz, mint a 2-5. ábrán látható jelek.

Amint az a 20. ábráról nyilvánvaló a pNPI132 plazmid, mint a pNPI106 plazmid, szelektálható marker génként az ipt gént tartalmazza és a kívánt gén modelljeként a T-DNS régióban az NPTII gént és a GUS gént. Azonban ebben az esetben a pSR1 plazmid rendszer két rekombináns szekvencia Rs-e közötti régió eltávolítható DNS elemként működik. Ezért, az ipt gént úgy inzertáljuk, hogy két azonos irányú rekombináns szekvencia tartsa.

### III. A pNPI132 plazmid dohányba való bejuttatása és az ilyen gént tartalmazó dohány analízise

Az 1. példa II-es és III-as lépései szerinti módon a pNPI132 plazmidot bejuttatjuk az *A. tumefaciens* LBA4404 törzsbe és a dohány levél korongjait (*Nicotiana tabacum* cv SR1) ezzel az *A. tumefaciens*-szel fertőzzük. Ezután a fertőzött leveleket 50 mg/liter acetosziringont tartalmazó homon mentes MS agar tenyész tápközegben tenyésztjük, majd 500 mg/liter carbenicillint tartalmazó homon mentes MS agar tenyész tápközegben tenyésztjük.

Egy hónappal később, a tenyésztett leveleket az ugyanilyen összetételű tenyész tápközegbe ültetjük át és a tenyésztést további egy hónapig folytatjuk. Ezután 48 ESP-t különítünk el.

Az ESP vonalakat újra átültetjük ugyanilyen összetételű tenyész tápközegbe és a tenyésztést folytatjuk. Körülbelül 1 hónappal később (nevezetesen az *A. tumefaciens*-szel való fertőzést követő 3 hónap után) vizuálisan normális morfológiájúnak detektált hajtásokat hozunk létre a 48 ESP vonal közül 7 esetében.

Ezeket a hajtásokat elkülönítjük és az ugyanilyen összetételű tenyész tápközegbe ültetjük, majd így 10 normális egyedet nyerünk.

Ezeket az egyedeket a 2. példa II-B lépésében szereplő PCR analízisnek megfelelően vizsgáljuk, feltéve, hogy a GUS gén detektálásához való primer párt használunk a 2. példa II-

B lépésében használt primereken felül. Az ezen primereket használva elvégzett PCR analízissel egy körülbelül 800 bázispár hosszúságú DNS fragmentet amplifikálunk, amikor az *ipt* gén jelen van; egy körülbelül 3 kb hosszúságú DNS fragmentet amplifikálunk ha az *ipt* gént a pNPI132 plazmid T-DNS régiójából kimetszettük az RS-ek által tartott rész kimetszésén keresztül (Ezek az eredmények megegyeznek a 2. példa II-B lépése analízisével nyert eredményekkel) és egy körülbelül 1,7 kb hosszúságú DNS fragmentet amplifikálunk ha a GUS gén van jelen. Ezeket az eredményeket a 21-23 ábrákon mutatjuk be és a 2. táblázatban. A 21-23 ábrákon a bal oldali értékek ugyanazok, mint a 6. ábrán szereplők.

## 2. táblázat

Egy dohányban - melybe a pNPI132 vektorral juttatjuk be a gént - levő transzgenikus gén  
analízisének eredményei

| ESP vonal<br>száma | Egyedi növény<br>száma | re ipt |      | re GUS<br>1,7 kb |
|--------------------|------------------------|--------|------|------------------|
|                    |                        | 800 bp | 3 kb |                  |
| 15                 | 1                      | -      | +    | +                |
|                    | 2                      | -      | +    | +                |
| 16                 | 1                      | -      | +    | +                |
| 17                 | 1                      | -      | +    | +                |
| 18                 | 1                      | -      | +    | +                |
| 19                 | 1                      | -      | +    | +                |
|                    | 2                      | -      | +    | +                |
| 20                 | 1                      | -      | +    | +                |
|                    | 2                      | -      | +    | +                |
| 21                 | 1                      | -      | +    | +                |

Megjegyzés: + azt jelzi, hogy a megfelelő DNS fragment amplifikálódik és a - azt jelzi, hogy nem amplifikálódik.

Amint az a 2. táblázatból nyilvánvaló, a szelektálható marker génként szolgáló ipt gén jelenlétét nem detektáltuk egyik olyan egyedben sem, melyet egyszerűen morfológiájuk vizuális megfigyelése alapján szelektáltunk, ehelyett az ipt gén kimetszését jelző DNS fragment amplifikációját detektáltuk. Ezenkívül, a kívánt géneként használt GUS gén jelenlétét az összes egyed esetében detektáltuk.

Másrészt, a kanamicin rezisztenciát az egyedek terminális rügyeinek használatával vizsgáljuk, melyeket a 48 ESP vonallal majdnem azonos időben differenciálódó nem-ESP-kból nyerünk és ezek normális megnyúlást és gyökerezést mutatnak 200 mg/liter kanamicint tartalmazó homon mentes MS agar tenyésztő tápközeget használva. Eredményként azt találtuk, hogy 16 egyedből 2 kanamicin rezisztens.

Ezt követően, ezeket a kanamicin rezisztens egyedeket további PCR analízises vizsgálatoknak vetjük alá, 14 kanamicin érzékeny egyed közül szelektált 3 egyeddel együtt az ESP-kból nyert egyedek esetében alkalmazott módszernek megfelelően. A 24. ábra azokat az eredményeket mutatja, ahol a bal oldalon jelölt értékek ugyanazok, mint a 6. ábrán bemutatottak.

Amint az a 24. ábrából egyértelmű, a két kanamicin rezisztens egyed az *ipt* gén és az RS-ek által tartott régió kimetszését jelző DNS fragment amplifikációját mutatja, valamint a GUS gén jelenlétét. Így bebizonyítottuk, hogy a pNPI132 plazmidból származó gének integrálódtak ezekbe a kromoszómákba. Ezzel szemben nem figyeltünk meg ilyen amplifikációt a három kanamicin érzékeny egyed esetében. Ezenkívül, ezen egyedek bármelyike (nevezetesen sem a kanamicin rezisztens, sem a kanamicin érzékeny egyedek) az *ipt* gén jelenlétét jelző DNS fragment amplifikációját mutatja.

Úgy becsüljük, hogy ezek az ESP-k képzésére képtelen törzsből nyert kanamicin rezisztens egyedek, a kanamicin érzékeny egyedekkel azonosak, olyan sejtekből származnak, melyek kromoszómájába az *A. tumefaciens*-szel való fertőzéskor a pNPI132 plazmidot bejuttattuk. Erre a feltételezésre alapozva nem lehetséges, hogy az ezen vektorból származó gének a kromoszómában vannak. Ezenkívül, nem ésszerű, hogy az *ipt* gént nem, azonban az NPTII gént (amit az a tény igazol, hogy ezek az egyedek kanamicin rezisztensek), valamint a GUS gént, mindegyiket teljes formájában a kromoszómákban tartalmazó egyedek, olyan

gyakorisággal jelennek meg, figyelembe véve, hogy ezek a gének ugyanebből a vektorból származnak.

Nevezetesen, ésszerű azt a következtetést levonni, hogy ezekbe a kanamicin rezisztens egyedekbe a pNPI132 plazmidot egyszer juttattuk be a kromoszómába. Azaz, úgy becsüljük, hogy a pNPI132 plazmid T-DNS régióját egyszer bejuttattuk a kromoszómába az *A. tumefaciens*-szel való fertőzés eredményeként, de az ezen vektorhoz használt pSR1 rendszer kiemelkedően hatékony funkciója az ipt gén kimetszését indukálja az ESP-k keletkezése előtt az *A. tumefaciens*-szel való fertőzést követően. Ennek eredményeként az NPTII gén és a GUS gén kizárólagosan megmarad a kromoszómában. Az a tény, hogy a kanamicin rezisztens egyedek a PCR analízisben az ipt gén és az RS-ek által tartott régió kimetszését mutatják szintén ezt a feltételezést támasztják alá.

## 6. példa

### I. Egy vektor megszerkesztése

A rolA-t, rolB-t és rolC-t tartalmazó és összesen 7,6 kb hosszúságú Rol géneket, melyeket a PbluescriptII SK+ plazmid (Toyobo Co., Ltd.) EcoRI restrikciós endonukleáz helyére inzertáltunk, az EcoRI restrikciós endonukleázzal hasítjuk. Ezt a fragmentet a pNPI129 plazmid EcoRI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk a pNPI700 plazmid létrehozása céljából.

Ebből a pNPI700 plazmidból a rol géneket, a karfiol mozaik vírus 35S promótert és a promóterhez kapcsolódó R gént és az ezen gének mindkét terminusán jelen levő Rs-eket kivágjuk az SseI restrikciós endonukleázzal és a pBI121 plazmid SseI restrikciós endonukleáz helyére inzertáljuk a kívánt pNPI702 plazmid létrehozása céljából.



Ezt a plazmidot szintén bejuttatjuk az *E. coli* JM109 törzsbe, és a Budapesti Szerződéssel összhangban *E. coli* JM109 (pNPI702) mikrobaként deponáljuk FERM BP-5066 katalógusszámon.

A pNPI702 plazmid megszerkesztése stratégiáját sematikusán a 25. ábrán mutatjuk be. Ennek T-DNS régiója restrikciós endonukleáz térképét a 26. ábrán mutatjuk be. A 25. és a 26. ábrán látható jelölések azonosak a 2.- 5. ábrán látható jelölésekkel.

Amint az a 26. ábrából nyilvánvaló, a pNPI702 plazmid hasonló a pNPI132 plazmidhoz, csupán a szelektálható marker gént változtatjuk ipt génről rol génekre. Az ezen vektorhoz használt rol gének jelen vannak a természetben az *A. rhizogenes* T-DNS-ében. Ismeretes, hogy ha a rol géneket bejutattjuk a növényi sejtekbe szőrös gyökerek képződnek a növényi szövetben és az ezen szőrös gyökerekből regenerálódott növény morfológiai rendellenességet, például törpeséget vagy valami hasonlót mutat.

## II. A pNPI702 plazmid dohányba való bejuttatása és a bejuttatott gént tartalmazó dohány analízise

Az 1. példa II-es és III-as lépései szerinti módon a pNPI702 plazmidot bejuttatjuk az *A. tumefaciens* LBA4404 törzsbe és a dohány levél korongjait ezzel az *A. tumefaciens*-szel fertőzzük.

Az ily módon fertőzött dohány levél korongokat 50 mg/liter acetosziringont tartalmazó homon mentes MS agar tenyész tápközegben tenyésztjük sötét helyen 3 napig, majd 400 mg/liter ticarcillint tartalmazó homon mentes MS agar tenyész tápközegben tenyésztjük. Körülbelül 15 nappal később a kezdeti tenyésztésből megfigyeljük a szőrös gyökerek képződését. A szőrös gyökereket egymás után eltávolítjuk és egy hajtás indukáló, 0,1 mg/liter alfa-naftalén-ecetsavat, 2,0 mg/liter benziladenint és 400 mg/liter ticarcillint tartalmazó

tenyésztés tápközegre helyezzzük. Ezután az újradifferenciálódott hajtások közül 18 hajtást tartunk normális morfológiájúnak és vizuálisan szelektáljuk ezeket, majd PCR analízisnek vetjük alá a 2. példa II-B lépésében leírtaknak megfelelően, primereket használva a rol géneket és az Rs-ek által tartott régió kimetszésének detektálására a körülbelül 3 kb hosszúságú DNS fragment (mint a 2.-5. példában és a 2. összehasonlító példában használt primerek) amplifikálásán keresztül és primerket használva a rol gének jelenlétének detektálásához a körülbelül 1,1 kb hosszúságú DNS fragment amplifikálásán keresztül. Ennek eredményeként megerősítettük, hogy a rol géneket tartalmazó és az Rs-ek által tartott régiót kimetszettük a 9 hajtás kromoszómájából.

## 7. példa

A 2. példában megszerkesztett pNPI106 vektort használva egy hibrid nyárfát (*Populus Sieboldii* x *Populus grandidentata*, fás növény) gén bejuttatásnak vetünk alá.

A hibrid nyár (Y63 törzs) steril lombikokban fejlesztett törzsét (Az Akita Jujo Chemicals Co., Ltd. kísérleti erdejéből származik) csomó mentes, 5 mm hosszúságú szekciókra vágjuk. Ezután vertikálisan két részre vágjuk a mintaként való használathoz és a mintákat pNPI106-tartalmú *A. tumefaciens* LBA4404-gyel fertőzzük az 1. példában leírtaknak megfelelően. Fertőzés után a törzs szekciókat homon mentes módosított MS agar tenyésztő tápközegre (2 w/v% szacharóz, és 0,8 w/v% agar tartalmaz) helyezzzük melyhez 40 mg/liter acetosziringont adunk és ebben a tápközegben tartjuk 3 napig. Ezt követően, a szekciókat ugyanilyen, azonban acetosziringon helyett 500 mg cabenicillint tartalmazó tápközegre helyezzzük és tovább szaporítjuk. Az itt alkalmazott módosított MS tápközeget úgy állítjuk elő, hogy a szokásos MS tápközeg ammónia-nitrogén és a nitrát nitrogén tartalmát sorrendben 10 mM és 30 mM mennyiségre változtatjuk.

Körülbelül két hónap elteltével az ezen szekciókból fejlődött oldal rügyeket szeparáljuk és újabb 2 hónapig tenyésztjük. Így 6 ESP vonalat nyerünk. Ezeket a törzseket tovább oltjuk és körülbelül 4 hónap után (azaz körülbelül az *A. tumefaciens*-szel való fertőzést követő 8 hónap után) az ESP-kból fejlődő morfológiailag normális hajtásokat figyelünk meg első alkalommal. Ezután ezeket a hajtásokat 2/3-ra hígított MS “gellan” gumi tápközegre (2 w/v% szacharózt és 0,3 w/v% gellan gumit tartalmaz) helyezzük, melyhez 0,05 mg/liter IBA-t (indolbutírsav) adunk és ebben tenyésztjük. Így 7, gyökereket fejlesztő normális egyedet nyerünk az összesen 2 ESP vonalból 10 hónap alatt az *A. tumefaciens*-szel való fertőzés után.

Ezután ezeket az egyedeket PCR analízisnek vetjük alá az 5. példa III. lépésében leírtaknak megfelelően. Eredményként egyik egyedben sem detektáltunk ipt gént. Másrészt viszont a GUS gén jelenléte detektáltuk ezek közül az egyedek közül kettőben. Így megerősítjük, hogy a jelen találmány vektora hatékonyan működik fás növényekben is.

Mellékesen a maradék 5 normális egyedben a GUS gén csupán egy részét detektáljuk. Úgy tűnik, hogy az ilyen egyedekben ha a pNPI106 plazmid vektorral bejuttatott Ac transzpozont kimetszük a kromoszómából az ipt génnel együtt, az ezek közelségében elhelyezkedő GUS gén részt vesz a kimetszésben és szétszakad.

A 27. ábra az ESP-ből differenciálódó normális hajtás állapotát mutatja.

## 8. példa

Az 5. példában a pNPI132 által bejuttatott génekkel rendelkező normális egyedet további gén bejuttatásnak vetjük alá a jelen találmány vektorát használva.

A pNPI132 GUS génjét egy HPT génnel (hygromycin rezisztencia gén) helyettesítjük. Az így kapott vektort (pNPI140, 28. ábra) használva a fent említett normális egyedeket gén bejuttatásnak vetjük alá az 1. példa II-es és III-as lépésében leírt módon. Így 10 ESP vonalat

nyerünk 40 nappal az ezen vektort tartalmazó *A. tumefaciens*-szel való fertőzést követően. Ezeket az ESP vonalakat szeparáljuk, azonos összetételű tenyésztápközegbe (500 mg/liter carbenicillint tartalmazó homon mentes MS agar tenyész tápközeg) helyezzük. Ennek eredményeként a hajtások differenciálódását, ami vizuálisan normális morfológiájú, figyeljük meg ezen vonalak egyikében 20 nappal (nevezetesen az *A. tumefaciens*-szel való fertőzés után 2 hónappal) később.

Az így differenciálódott normális hajtások egyikét PCR analízisnek vetjük alá az 1. példa IV-B lépésében leírt módon. A 29. ábra mutatja az eredményeket. Meg kell említeni, hogy az NPTII génre és a HPT génre való kötődéshez tervezett primer párt használunk a kromoszómális DNS-ből az ipt gén és az Rs-ek által tartott régió kimetszéséhez és egy másik primer párt használunk a HPT gén jelenlétének detektálásához (sorrendben a körülbelül 4 kb hosszúságú és körülbelül 1 kb hosszúságú DNS fragmentek amplifikációján keresztül detektáljuk) az 1. példa IV-B lépésében használt primereken keresztül. A 29. ábrán a bal oldalon mutatott értékek azonosak a 6. ábrán bemutatottakkal.

Amint azt a 29. ábra világosan mutatja, a PCR analízisben a hajtásból extrahált kromoszómális DNS a körülbelül 4 kb hosszúságú DNS fragment amplifikációját mutatja, mely azt jelzi, hogy az ipt gént kimetszettük az RS-ek által tartott régió kimetszésén keresztül, és a körülbelül 1 kb hosszúságú DNS fragment amplifikációját mutatja, mely a HPT gén jelenlétét jelzi. Másrészt viszont a körülbelül 800 bp hosszúságú DNS fragment amplifikációját - mely az ipt gén jelenlétét jelzi - nem detektáljuk ugyanebben a DNS-ben. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az ipt gént, melyet egyszer bejuttattunk ezen hajtás kromoszómális DNS-ébe, az Rs-ek által tartott régió kimetszése révén kimetszettük és így eltűnt, míg a HPT gén még mindig a DNS-ben maradt. Azaz a pNPI132 plazmiddal bejuttatott kívánt génnel (azaz az NPTII gén és a GUS gén) rendelkező egyedbe egy újabb kívánt gént juttatunk be (azaz a HPTY gént) egy olyan vektort használva, melyben a kívánt génre

vonatkozó szerkezetet kizárólagosan megváltoztatjuk (azaz ugyanazt az ipt gént használjuk szelektálható marker génként) a tenyésztés, vizuális szelekció és szeparáció ismételtesével. Ezenkívül, az eredmények azt mutatják, hogy lehetőség van egy harmadik, negyedik vagy még több kívánt gén bejuttatására ugyanezen szelektálható marker gén használatával.

Amint az a fent leírt példákban egyértelmű a kapott ESP vonalak mindig rendelkeznek az ipt génnel kromoszómájukon belül, ahogy azt a 6. ábra mutatja. Ezenkívül az ESP-k, melyek figyelemre méltó, vizuálisan azonosítható morfológiai rendellenességet mutatnak, kanamicin rezisztenciát mutatnak kivétel nélkül az NPTII gén expressziójának köszönhetően, ami a modellként szolgáló kívánt gén, és együtt juttatjuk be az ipt génnel. Ez azt bizonyítja, hogy egy ilyen MAI gén teljes mértékben rendelkezésre áll szelektálható marker génként egy gén növénybe való bejuttatásához és, hogy a jelen találmány, szelektálható marker génként a MAI gént tartalmazó vektora szintén rendelkezésre áll egy gén növénybe való bejuttatásához.

Ha egy gént a pNPI106 vektort - melyben az ipt gén az Ac transzpozon belül integrálódik - használva bejuttatunk egy növénybe egy olyan hajtást, vagy hasonlót nyerünk a szövetből, mely elveszítette ESP-képző képességét az ipt gén kromoszómából való eltűnésének köszönhetően, míg a kívánt gén (NPTII gén és/vagy GUS gén) által biztosított tulajdonságot megtartja - mely valamikor ESP-t hozott létre a tenyésztés kezdeti stádiumában a gén bejuttatási folyamata után közvetlenül, ahogy azt az 1. táblázat és a 13., 14. és 16. ábrák mutatják. Ezenkívül, ezen kinyert szövet (azaz hajtás, vagy valami hasonló, mely elveszítette ESP képző képességét) morfológiája vizuálisan azonosítható amint azt az 15. és 27. ábrák mutatják. Ezenkívül, ha ezt szelektáljuk, szeparáljuk és tenyésztjük, egy erőteljesen kifejlődött és meggyökerezett egyedeket nyerünk, mely normális morfológiával rendelkezik. Ezenkívül, az ESP-képző képességet elvesztett hajtásból nyert szövetből redifferenciálódott szövetek szintén normális morfológiát mutatnak az ESP képző képesség nélkül is. Ez azt bizonyítja, hogy egy ilyen hajtás vagy hasonló egyforma sejtekből áll.

Azonos eredményeket figyeltünk meg, ha egy hely-specifikus rekombinációs rendszerből származót használunk eltávolítható DNS elemként és ha a rol géneket használjuk MAI génként. Azaz ha egy gént bejuttatunk egy növénybe egy olyan vektort használva, melyben a transzpozonnal vagy az 1.-4. és 7. példában használt vektor transzpozonjával és ipt génjével kapcsolatos szerkezetet a megfelelő fent említett rekombinációs rendszerrel helyettesítjük és/vagy az 5. és 6. példában leírt rol génekkel a morfológiailag normális szövet és növény - melyben a MAI gén eltűnt a kromoszómából, míg a kívánt gén megmaradt - nyerhető abból a szövetből, mely rendellenes morfológiát mutat közvetlenül a gén bejuttatása után (21.-23. ábrák, 2. táblázat). Ezenkívül, az is lehetséges, hogy ugyanabba az egyedbe többször juttassunk be kívánt géneket a gén bejuttatás, tenyésztés és vizuális szelekció lépéseinek ismétlésével olyan vektort használva, melyben a kívánt génre vonatkozó szerkezetet kizárólagosan megváltoztatjuk, míg ugyanazt az morfológiai rendellenességet indukáló gént használjuk szelektálható marker génként (8. példa, 29. ábra).

Ennek megfelelően, ha egy ilyen vektort alkalmazunk, melyben a MAI gént használjuk szelektálható marker génként és úgy pozicionáljuk, hogy elválaszthatatlanul funkcionáljon az eltávolítható DNS elemmel, egy csupán olyan sejtekből álló szövetet nyerünk, mely sejtekben a kívánt gén egyedül marad a kromoszómában és megtartja funkcióját, pusztán úgy hogy a következő lépéseket végezzük el: (1) a gén bejuttatás után azonnal tenyésztjük a sejteket és vizuálisan szelektáljuk a morfológiailag rendellenes szövetet, mely a tenyésztés során jelenik meg, (2) ezt a morfológiailag rendellenes szövetet tovább tenyésztjük és vizuálisan szelektáljuk tenyésztés során megjelenő morfológiailag normális szövetet. Ezután a csupán ilyen sejtekből álló növény nyerhető a morfológiailag normális szövetből.

Ezenkívül, ha egy hely-specifikus rekombinációs rendszerből származót használunk eltávolítható DNS elemként, mivel ennek kimetszése gyorsan bekövetkezik és meglehetősen nagy gyakorisággal, a morfológiailag rendellenes szövetből megjelenő morfológiailag

normális szövet szintén gyorsan detektálható és számos normális egyed myerhető ezekből jó hatékonysággal.

A 3. táblázat azt a hatékonyságot mutatja, mellyel normális egyedeket nyerünk a morfológiailag rendellenes szövetből ha a transzpozont vagy egy a hely-specifikus rekombinációs rendszerből származót használunk eltávolítható DNS elemként a jelen találmány vektorában.

### 3. táblázat

Egy eltávolítható DNS elem típusától függő normális egyed nyerésének különböző hatékonysága

|          | Vektor  | Eltávolít-ható<br>DNS elem                                                                           | Az ESP<br>vonalak száma | Azon vonalak<br>száma,<br>melyben<br>normális egyed<br>regenerálódik |
|----------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 3. példa | pNPI106 | Ac<br>(transzpozon)                                                                                  | 63                      | 2<br>(7 egyed)                                                       |
| 5. példa | pNPI132 | A pSR1<br>rendszer RS-ei<br>által tartott<br>régió (hely<br>specifikus<br>rekombinációs<br>rendszer) | 48                      | 7<br>(10 egyed)                                                      |

Megjegyzés:

1. Az ESP-t a tenyésztés 2 hónapja után szelektáltuk
2. A normális hajtás a 3. példában a tenyésztés 4 hónapja után detektálható, az 5. példában a tenyésztés 3 hónapja után.
3. Az egyes fent említett normális egyedek egy GUS gént tartalmaznak a kívánt gén modelljeként.

Az 1. - 5. példában a hormon mentes körülmények között a transzgenikus sejteket tartalmazó szövet proliferálódik, differenciálódik és oldalhajtásokat hoz és a növény regenerálódik. Ez feltehetően az ipt gén hatásának tudható be, melyet a transzgenikus sejt kromoszómájába juttatunk be szelektálható marker génként. Azaz, ezen gén expressziója révén a növényi hormon túltermelődik a sejten belül. Következésképpen, a termelt növényi hormon



az ipt gént tartalmazó sejtben nem csupán a sejt olyan szövetté, mint például az ESP, való differenciálódását befolyásolja, hanem a sejtektől bizonyos távolságra levő szomszédos szövetekét, miáltal a tenyész tápközegben a növényi hormon mesterséges hozzáadásával elért állapot jön létre.

A jelen találmány vektorában a MAI gént használjuk szelektálható marker génként. Ezért ha a gén bejuttatást a növénybe ezzel a vektorral hajtjuk végre a szövet, melybe a kívánt gént bejuttatjuk, szelektálható a gén bejuttatáshoz kezelésnek alávetett sejtek tenyésztésével, közönséges tenyész tápközegben, közönséges tenyésztési körülményeket használva bármilyen kémiai anyag szelekció céljából történő hozzáadása nélkül, valamint lehetőség van a kapott morfológiailag rendellenes szövetet vizuális azonosítására. Ennek megfelelően, az eljárás egyszerűsített és a növényi sejt aktivitása nem csökken a szelekció alatt.

Ezenkívül, egy ilyen MAI gén öröklődik a növényben, vagy baktériummal való fertőzés segítségével juttatható a növénybe, vagy valami hasonló módon. Emiatt még ha a MAI gén expresszáldódik is a növényi sejtben, melybe bejuttattuk, biztonságossága meglehetősen magasnak tekinthető az emberi szervezetbe való bejutás során.

Ezenkívül, ha MAI génként az ipt gént használjuk, a transzgenikus sejtet tartalmazó szövet szaporodik és oldal hajtásokat hoz létre ezen gén működésének eredményeként, lehetővé téve további növényi hormonok tenyész tápközeghez való hozzáadásának elhagyását, amit általában kötelezőnek tartanak a növényi sejtek tenyésztésében a proliferációhoz és differenciálódáshoz.

Ezenkívül, ebben a vektorban a szelektálható marker génként használt MAI gént olyan pozícióban jutattuk be, hogy elválaszthatatlanul funkcionál az eltávolítható DNS elemmel, miáltal, ha a szelektálható marker gént eltávolítjuk a DNS-ből, melyben ez a gén létezik és funkcionál, a DNS elem kimetszésén keresztül egy adott arányban a gén növényi sejtbe való bejuttatása után és elveszíti saját funkcióját. Így, csupán a vektor olyan pozíciójában levő

kívánt gén, hogy nem funkcionál az eltávolítható DNS elemmel, marad ugyanabban a DNS-ben és tartja meg funkciójának expresszáására való képességét. Ennek megfelelően, ebben a szerkezetben a vektor a génre vonatkozólag többszörös, egy bizonyos növénybe való bejuttatást okoz csupán az által, hogy megváltoztatjuk a kívánt gén bejuttatandó részét a marker gén és más gének változtatása nélkül. Így a többszörös bejuttatás korlátlan számban hajtható végre.

Ezenkívül, ebben az esetben szelektálható marker génként a MAI gén funkciójának elvesztése vizuálisan detektálható a transzgenikus szövet morfológiai változásának köszönhetően ezen gén bejutattása következtében. Ezért, a csupán olyan sejtekből álló szövet, melyekben a kívánt gén a kromoszómában marad, és megőzi funkcióját biztonságosan és könnyen szelektálható. Ennek eredményeként a gén többszörös bejuttatása magas hatékonysággal hajtható végre és a csupán ilyen sejtekből álló transzgenikus növény nevezetesen, a szelektálható marker gén hatásától, valamint bármilyen egészségre vonatkozó kockázat - amit a szelektálható marker gén terméke okozna - mentes egyed nyerhető keresztezési lépés elvégzése nélkül.

#### Megjegyzés

A specifikációban felsorolt EGY DEPONÁLT MIKROORGANIZMUSRA VONATKOZÓ JELÖLÉSEK a következők:

- 1) FERM BP-5063 . oldal . sor
- 2) FERM BP-5064 . oldal . sor
- 3) FERM BP-5065 . oldal . sor
- 4) FERM BP-5066 . oldal . sor

A fenti katalógusszámmal azonosított törzset azonos időben a következő deponáló szervnél is deponáltuk.

A deponáló szerv neve:

National Institute of Bioscience and Human-Technology

Agency of Industrial Science and technology

(Osamu Suzuki, Dr. igazgató)

A deponáló szerv címe:

1-3, Higashi 1 chome, Tsubaka-shi, Ibaraki-ken 305 JAPAN

A deponálás ideje 1995 április 5.

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy tervezett gén növénybe való bejuttatására szolgáló vektor azzal jellemezve, hogy a vektor a tervezett gént, és marker génként legalább egy morfológiai rendellenességet indukáló gént tartalmaz, ahol az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén egy citokinin szintézises gént jelent.
2. Az 1. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett citokinin szintézises gén egy ipt, izopenteniltranszferáz gén, mely az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS-ében található.
3. Egy kívánt gén, egy szelektálható marker génnel együtt növényi sejtekbe való bejuttatására szolgáló vektor azzal jellemezve, hogy ha az említett szelektálható marker gén egyszer expresszálja funkcióját a növényi sejtben, akkor eltávozik a DNS-ből, ahol létezik az eltávolítható DNS elem viselkedésének megfelelően és az említett szelektálható marker gén funkciója eltűnik és az említett szelektálható marker gén expressziója és funkciójának eltűnése a növényi sejtekből - mely sejtekbe az említett szelektálható marker gént bejutattuk - származó szövetek morfológiai változásai révén detektálhatók.
4. Egy kívánt gén növénybe való bejuttatására szolgáló vektor azzal jellemezve, hogy a vektor az említett kívánt gént, szelektálható marker génként legalább egy morfológiai rendellenességet indukáló gént és egy eltávolítható DNS elemet tartalmaz, az említett morfológiai rendellenességet indukáló gént úgy pozicionáltuk, hogy együtt távozik az eltávolítható DNS elemmel együtt és ahol az említett kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy az az eltávolítható DNS elemmel együtt nem távozik el.

5. A 4. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén az eltávolítható DNS elemen belül létezik.

6. A 4. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett eltávolítható DNS elem egy transzpozont jelent.

7. A 4. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett eltávolítható DNS elem egy hely-specifikus rekombinációs rendszerből származik.

8. A 4. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gént az *Agrobacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusból nyerjük.

9. A 4. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén egy citokinin szintézises gént jelent.

10. A 9. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett citokinin szintézises gén egy ipt, izopenteniltranszferáz, gén, mely az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS-ében található.

11. A 4. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén legalább egy a rol gének közül szelektált gént jelent.

12. A 11. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy az említett rol gének a rolA-t, rolB-t és a rolC-t tartalmazó rol géneket jelentik, melyek az *Agrobacterium rhizogenes* T-DNS-ében található.

13. Egy szelektálható marker gén hatásától mentes transzgenikus növény előállítására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy, az eljárás a következő lépéseket foglalja magába:

(A) egy vektort bejuttatunk egy növényi sejtbe, ahol az említett vektor az említett kívánt gént, szelektálható marker génként legalább egy morfológiai rendellenességet indukáló gént és egy eltávolítható DNS elemet tartalmaz, ahol az említett morfológiai rendellenességet indukáló gént úgy pozicionáltuk, hogy együtt távozik az eltávolítható DNS elemmel és ahol az említett kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy az az eltávolítható DNS elemmel nem távozik,

(B) az (A) lépésben nyert növényi sejtet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag rendellenes növényi szövetet detektáljuk, és az említett morfológiailag rendellenes szövetet szelektáljuk, és

(C) a (B) lépésben szelektált említett morfológiailag rendellenes szövetet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag normális szövetet detektáljuk és az említett morfológiailag normális szövetet szelektáljuk.

14. A 13. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén az eltávolítható DNS elemen belül létezik.

15. A 13. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett eltávolítható DNS elem egy transzpozont jelent.

16. A 13. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett eltávolítható DNS elem egy hely-specifikus rekombinációs rendszerből származik.

17. A 13. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gént az *Agrobacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusból nyerjük.

18. A 13. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén egy citokinin szintézises gént jelent.

19. A 18. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett citokinin szintézises gén egy ipt, izopenteniltranszferáz, gén, mely az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS-ében található.

20. A 13. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén legalább egy a rol gének közül szelektált gént jelent.

21. A 20. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett rol gének a rolA-t, rolB-t és a rolC-t tartalmazó rol géneket jelentik, melyek az *Agrobacterium rhizogenes* T-DNS-ében találhatók.

22. Legalább két kívánt gén növénybe való bejuttatására szolgáló módszer, azzal jellemezve, hogy az eljárás a következő lépések legalább kétszeri elvégzését foglalja magába:

(A) egy növényi sejtbe egy olyan vektort juttatunk be, mely vektor a kívánt gént, szelektálható marker génként legalább egy morfológiai rendellenességet indukáló gént és egy eltávolítható DNS elemet tartalmaz, az említett morfológiai rendellenességet indukáló gént úgy pozicionáltuk, hogy együtt távozik az eltávolítható DNS elemmel és ahol az említett kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy az az eltávolítható DNS elemmel nem távozik el,

(B) az (A) lépésben nyert növényi sejtet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag rendellenes növényi szövetet detektáljuk, és az említett morfológiailag rendellenes szövetet szelektáljuk, és

(C) a (B) lépésben szelektált említett morfológiailag rendellenes szövetet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag normális szövetet detektáljuk és az említett morfológiailag normális szövetet szelektáljuk.

23. A 22. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén az eltávolítható DNS elemen belül létezik.

24. A 22. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett eltávolítható DNS elem egy transzpozont jelent.

25. A 22. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett eltávolítható DNS elem egy hely-specifikus rekombinációs rendszerből származik.

26. A 22. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gént az *Agrobacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusból nyerjük.



27. A 22. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén egy citokinin szintézises gént jelent.

28. A 27. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett citokinin szintézises gén egy ipt, izopenteniltranszferáz, gén, mely az *Agrobacterium tumefaciens* T-DNS-ében található.

29. A 22. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett morfológiai rendellenességet indukáló gén legalább egy a rol gének közül szelektált gént jelent.

30. A 29. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett rol gének a rolA-t, rolB-t és a rolC-t tartalmazó rol géneket jelentik, melyek az *Agrobacterium rhizogenes* T-DNS-ében találhatók.

31. Egy szelektálható marker gén hatásától mentes transzgenikus növény azzal jellemezve, hogy egy olyan módszerrel állítjuk elő, mely módszer a következő lépéseket foglalja magába:

(A) egy növényi sejtbe egy olyan vektort juttatunk be, mely említett vektor a kívánt gént, szelektálható marker génként legalább egy morfológiai rendellenességet indukáló gént és egy eltávolítható DNS elemet tartalmaz, ahol az említett morfológiai rendellenességet indukáló gént úgy pozicionáltuk, hogy együtt távozik az eltávolítható DNS elemmel és ahol az említett kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy az az eltávolítható DNS elemmel együtt nem távozik el,

(B) az (A) lépésben nyert növényi sejtet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag rendellenes növényi szövetet detektáljuk, az említett morfológiailag rendellenes szövetet szelektáljuk,

(C) a (B) lépésben szelektált említett morfológiailag rendellenes szövetet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag normális szövetet detektáljuk és az említett morfológiailag normális szövetet szelektáljuk, és

(D) az említett morfológiailag normális szövetet növénné regeneráltatjuk.

32. Két vagy több kívánt gént tartalmazó növény azzal jellemezve, hogy olyan módszerrel állítjuk elő, mely módszer a következő lépéseket foglalja magába:

(A) egy növényi sejtbe egy olyan vektort juttatunk be, mely említett vektor a kívánt gént, szelektálható marker génként legalább egy morfológiai rendellenességet indukáló gént és egy eltávolítható DNS elemet tartalmaz, az említett morfológiai rendellenességet indukáló gént úgy pozicionáltuk, hogy együtt távozik az eltávolítható DNS elemmel és ahol az említett kívánt gént úgy pozicionáltuk, hogy az eltávolítható DNS elemmel együtt nem távozik el,

(B) az (A) lépésben nyert növényi sejtet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag rendellenes növényi szövetet detektáljuk, és az említett morfológiailag rendellenes szövetet szelektáljuk,

(C) a (B) lépésben szelektált említett morfológiailag rendellenes szövetet szaporítjuk, a szaporítás során megjelenő morfológiailag normális szövetet detektáljuk és az említett morfológiailag normális szövetet szelektáljuk,

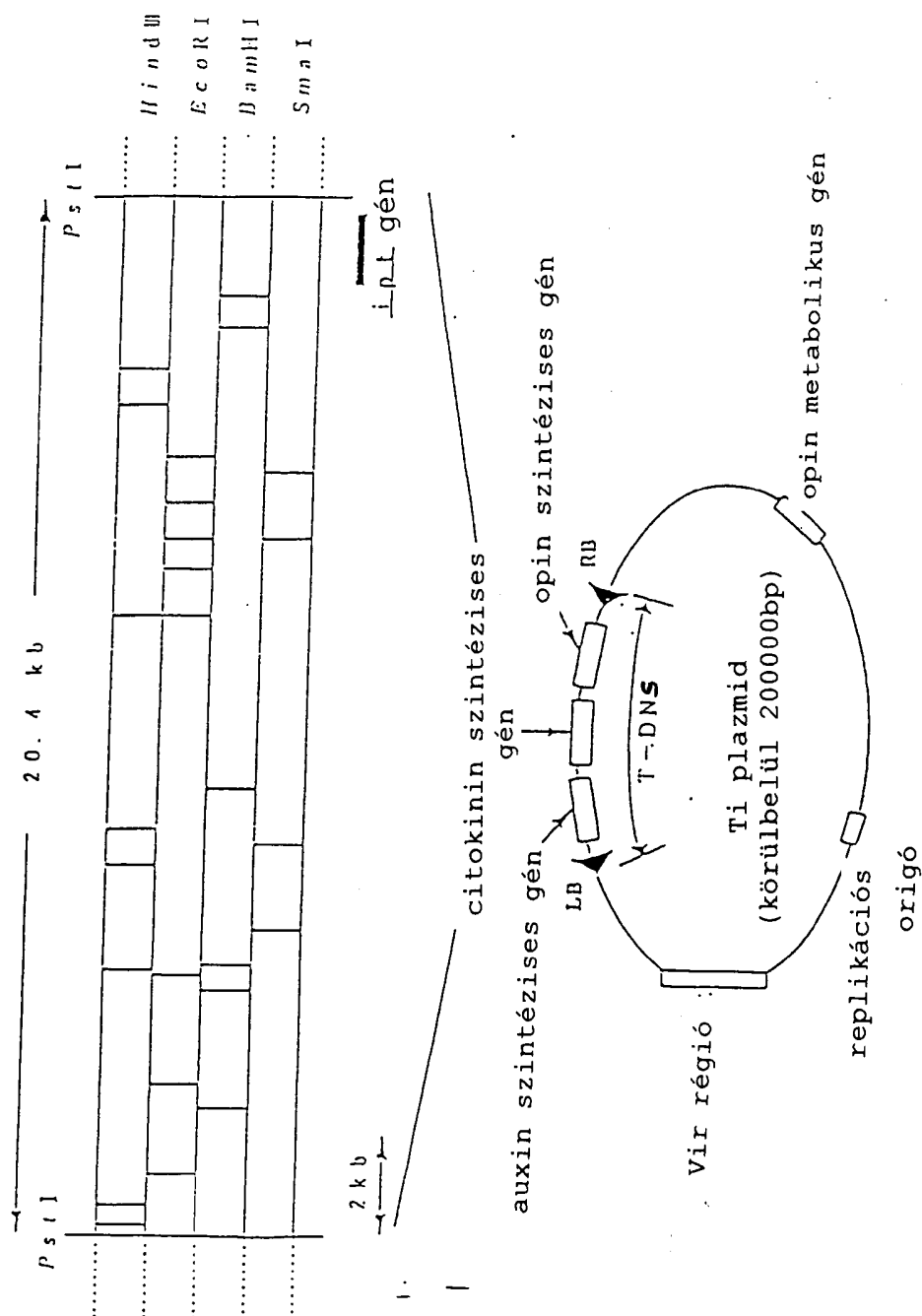
(D) az (A) - (C) lépéseket legalább egyszer elvégezzük, és

(E) az említett morfológiailag normális szövetet növénné regeneráltatjuk.

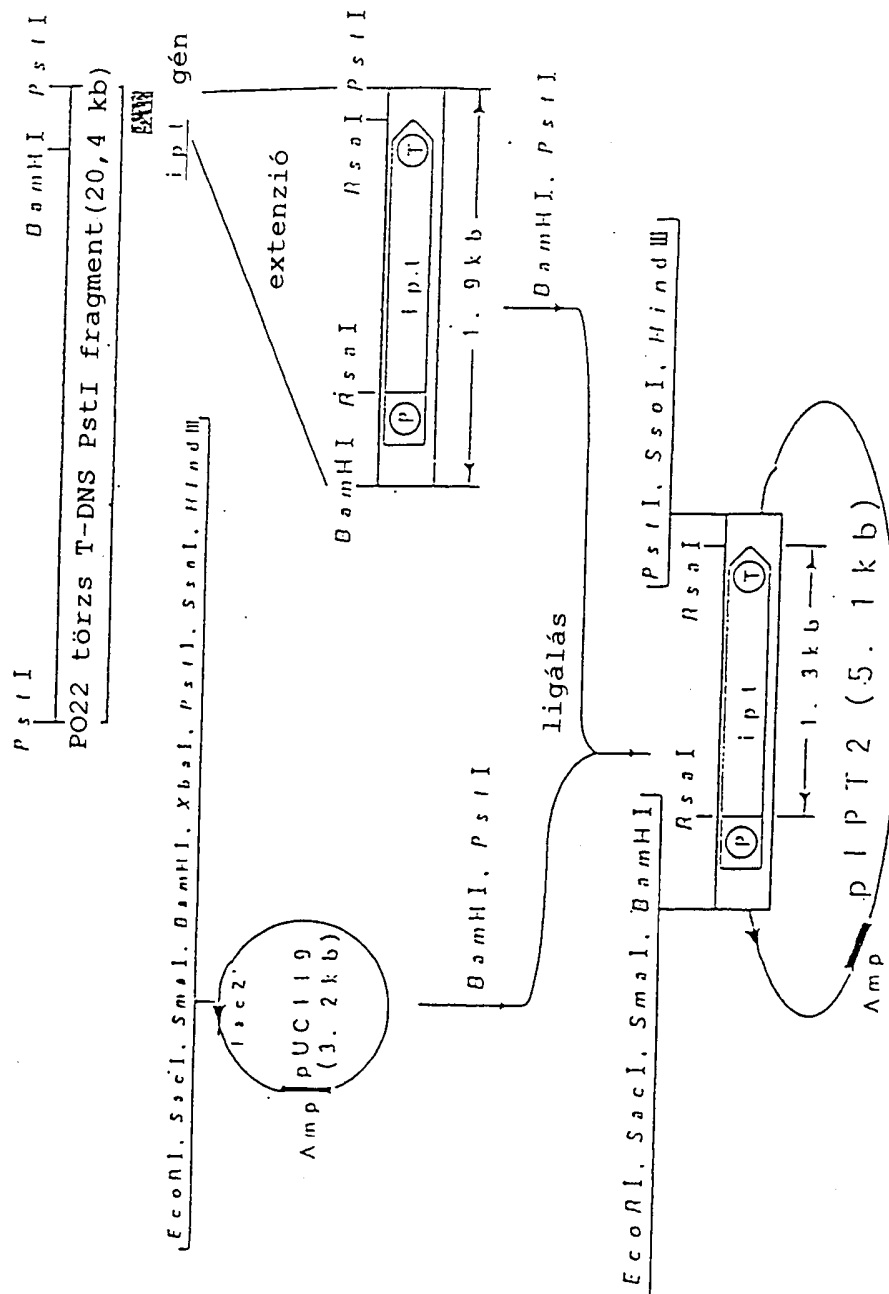


ifj. Szentpéteri Ádám  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda vezetője  
H 1062 Budapest, Andrássy út 113  
Telefon 34-24-950, Fax 34-24-323

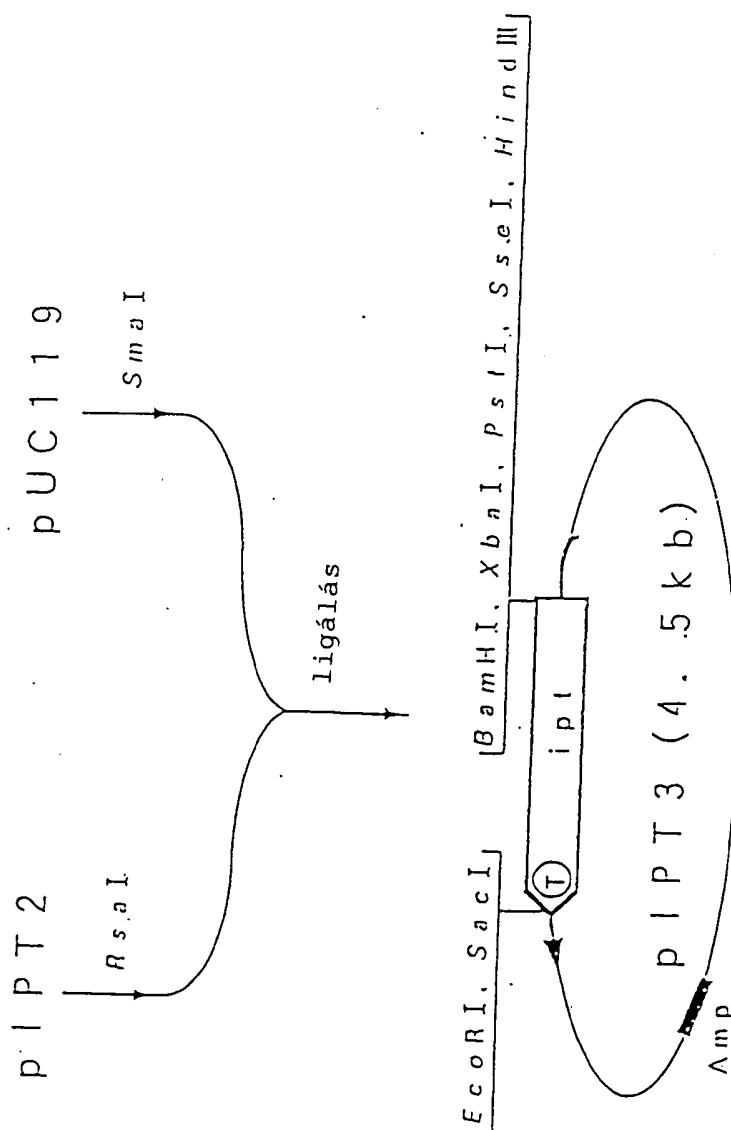
1. ábra



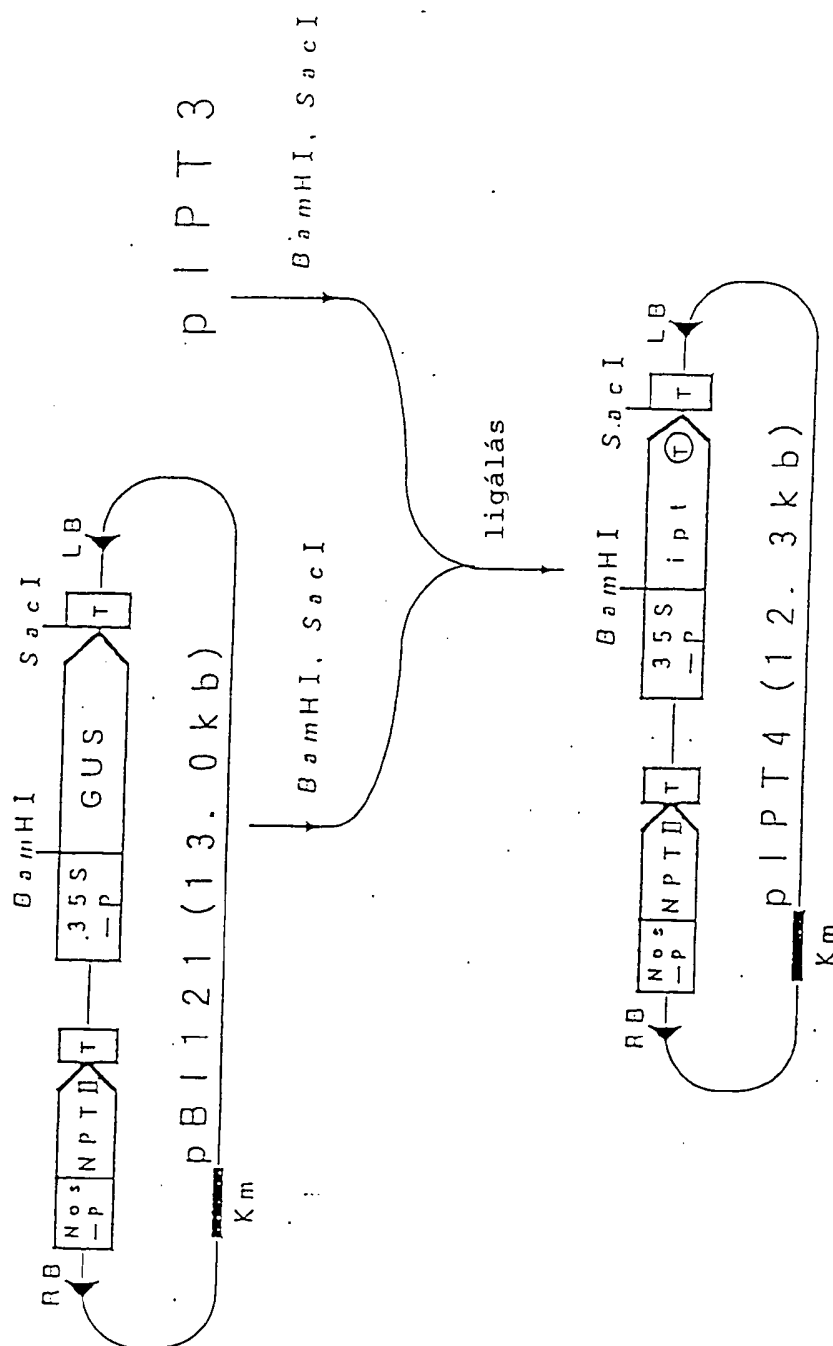
2. ábra



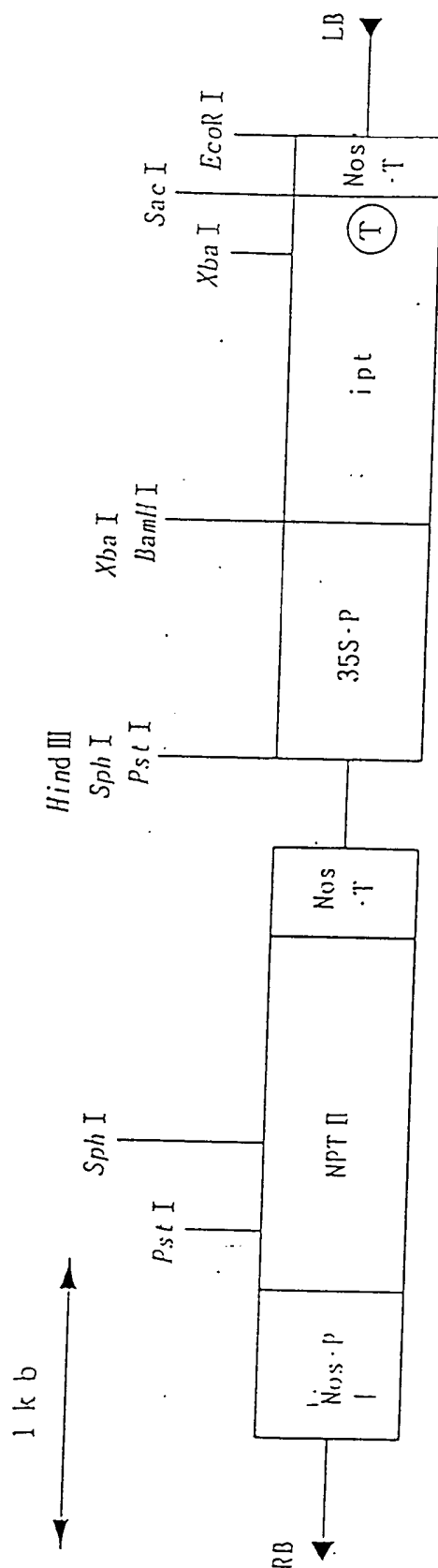
3. ábra



4. ábra



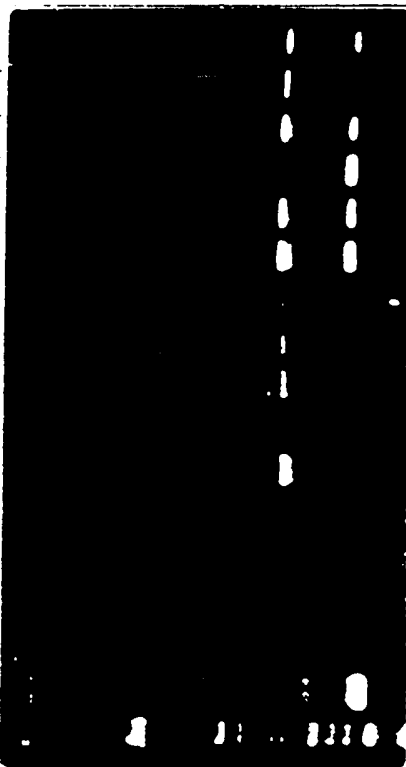
5. ábra



p I P T 4 (12.3 kb)

6. ábra

1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17



4361  
2322  
2027  
1353  
1037  
872  
603

1. sáv DNS méret marker

$\lambda$  / *Hind* III —  $\phi$  X 174 / *Hae* III  
(TOYOBO CO., LTD gyártja)

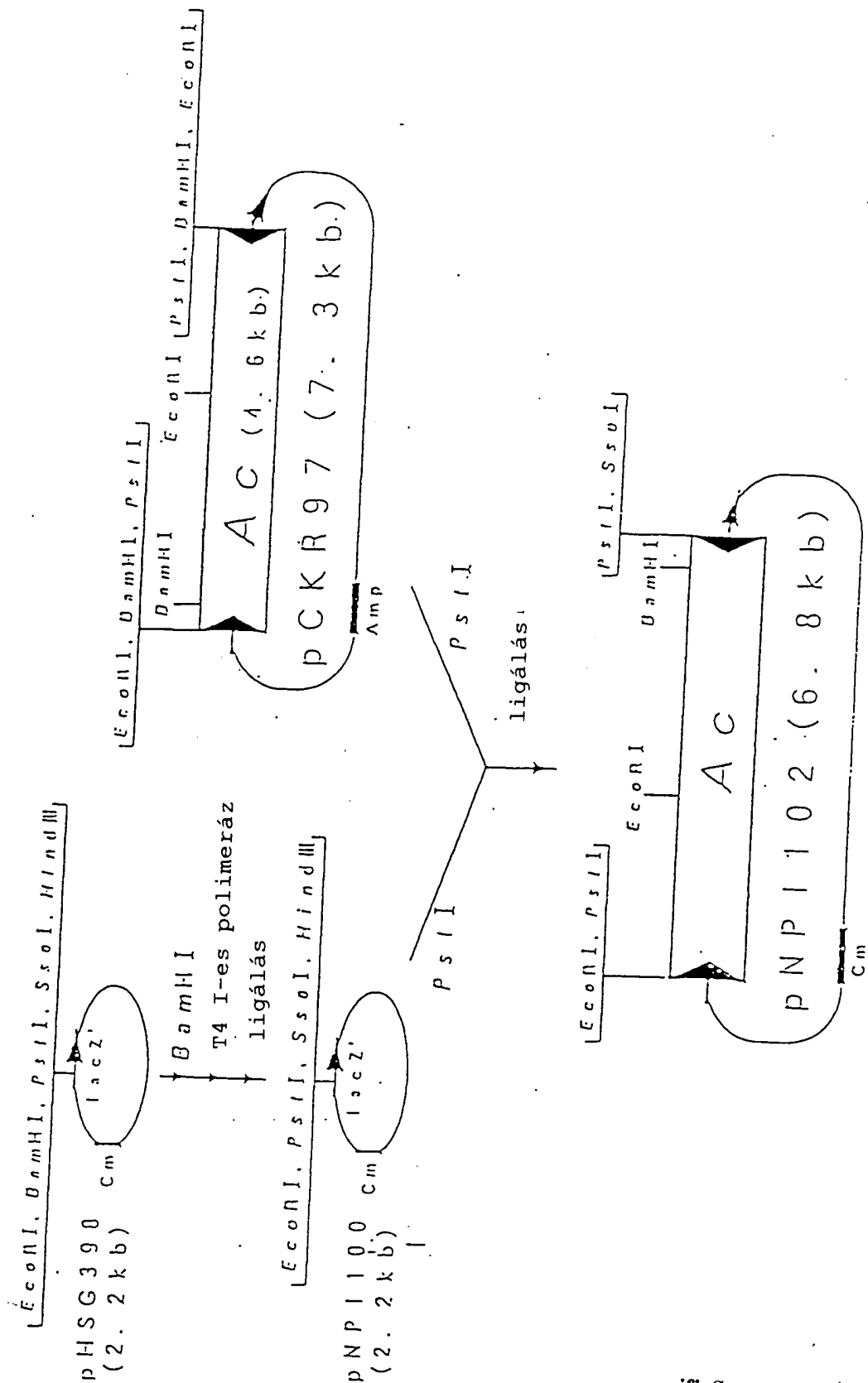
2. sáv kontroll

3.-11. sávok nem extrém hajtasos fenotípus

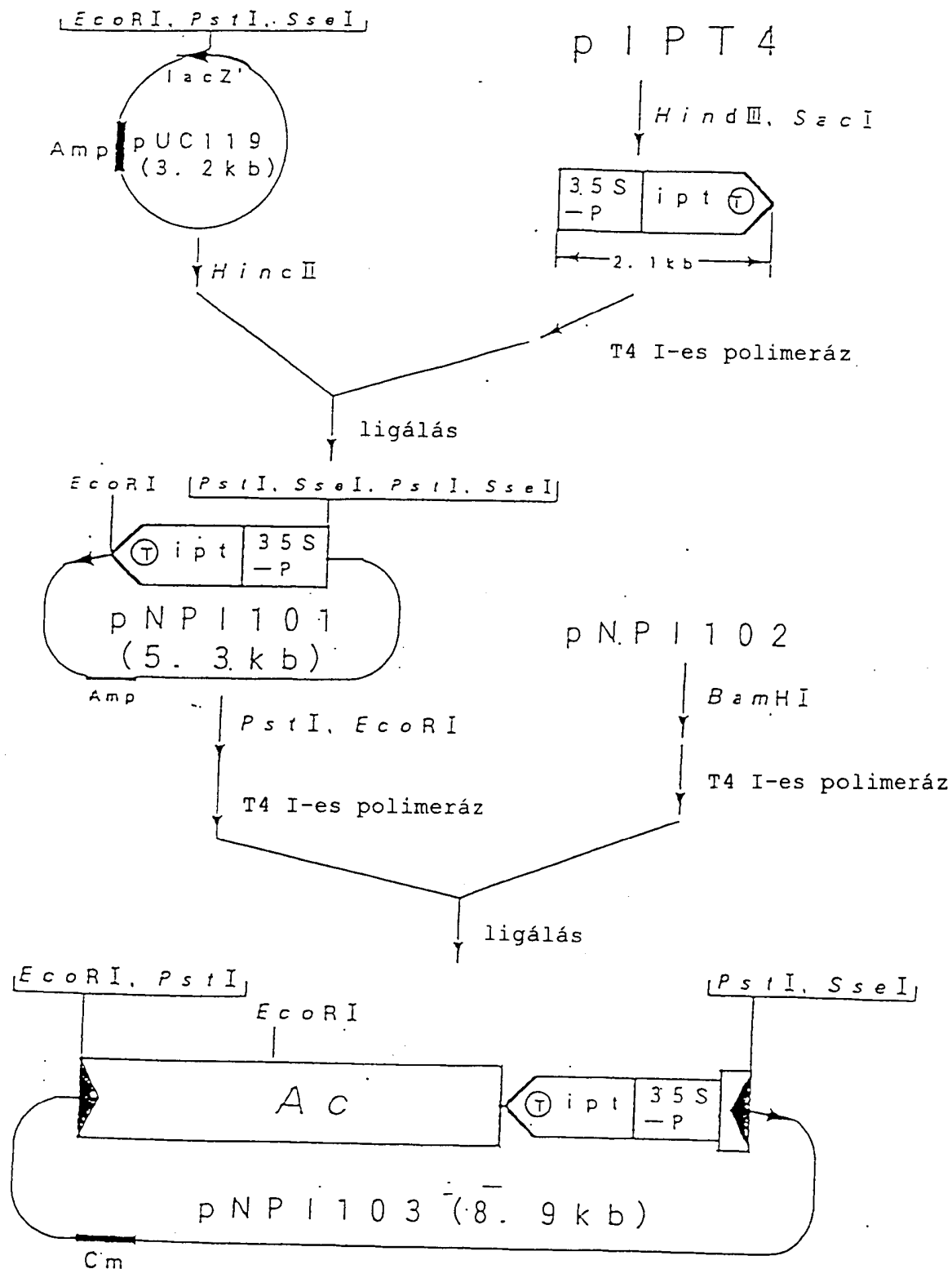
12.-17. sávok extrém hajtasos fenotípus



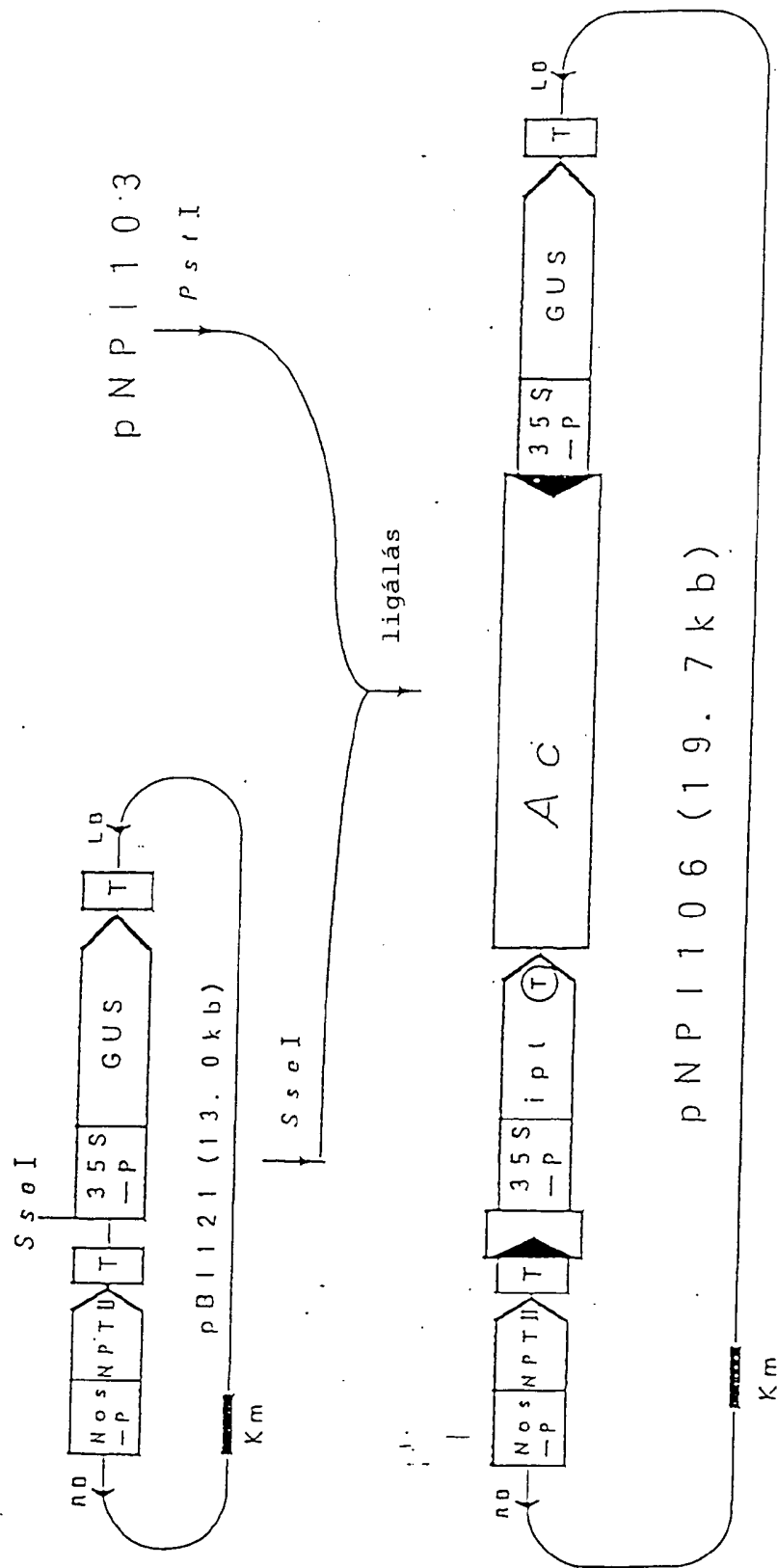
7. ábra



8. ábra

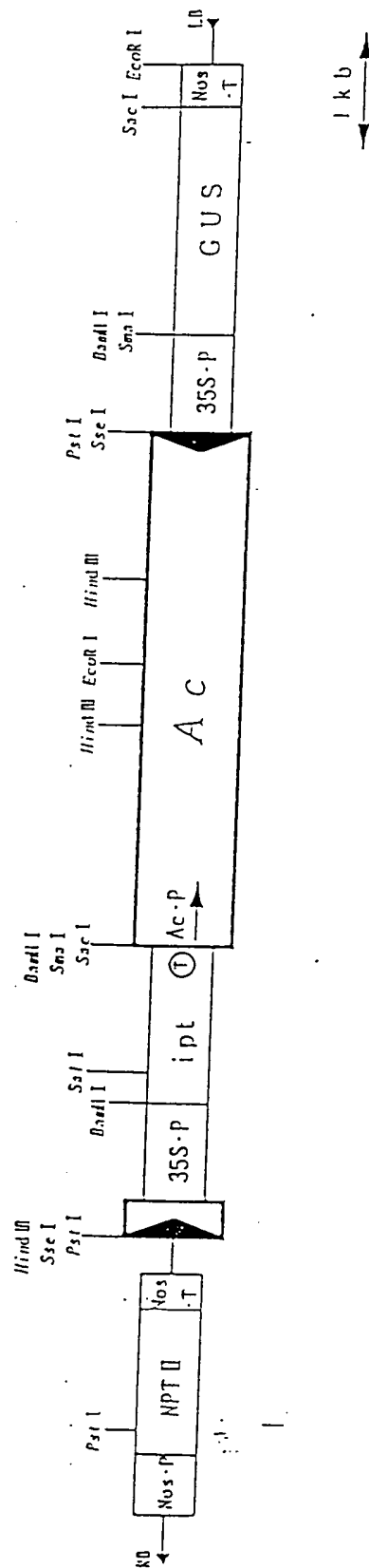


9. ábra

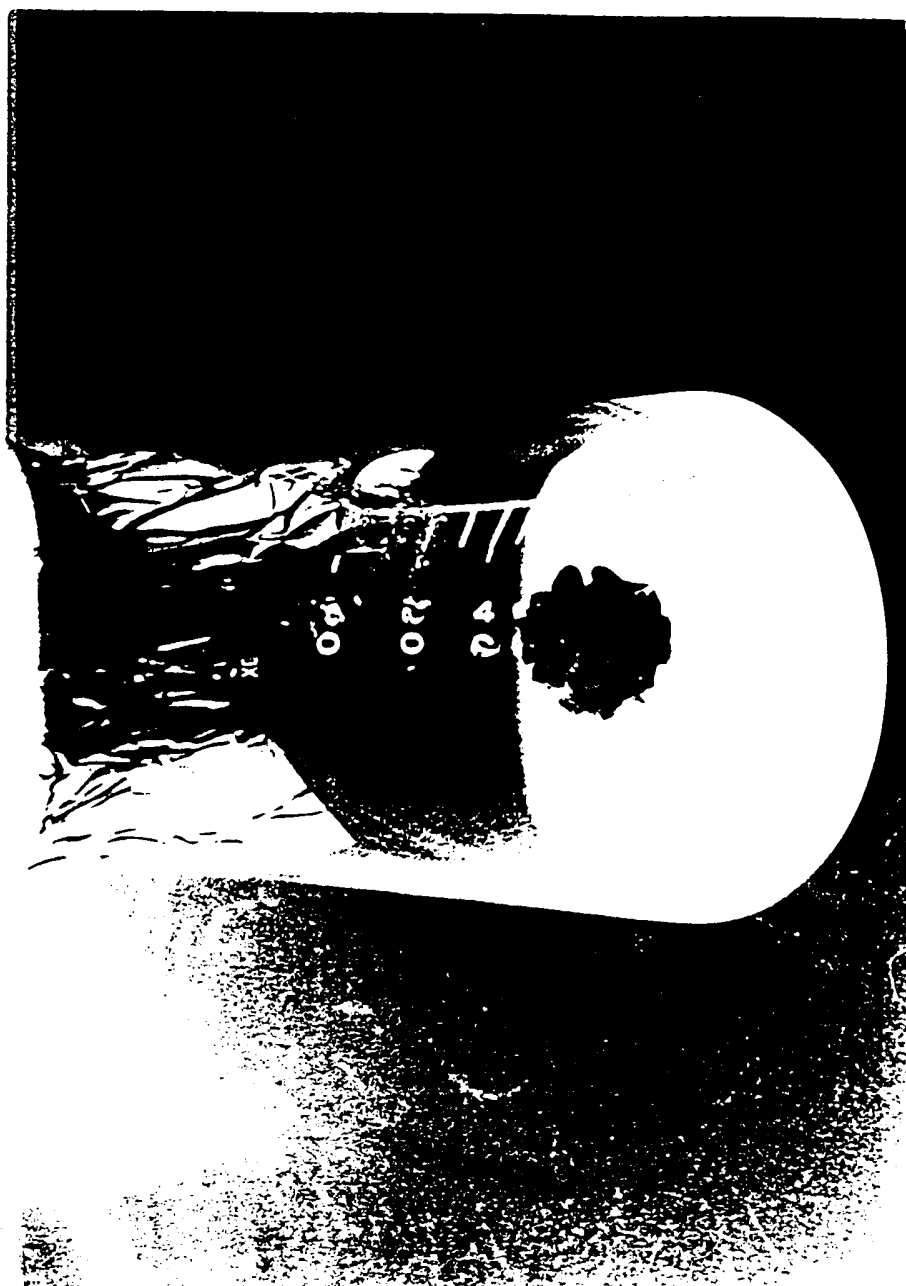


10. ábra

p N P I 1 0 6



11. ábra

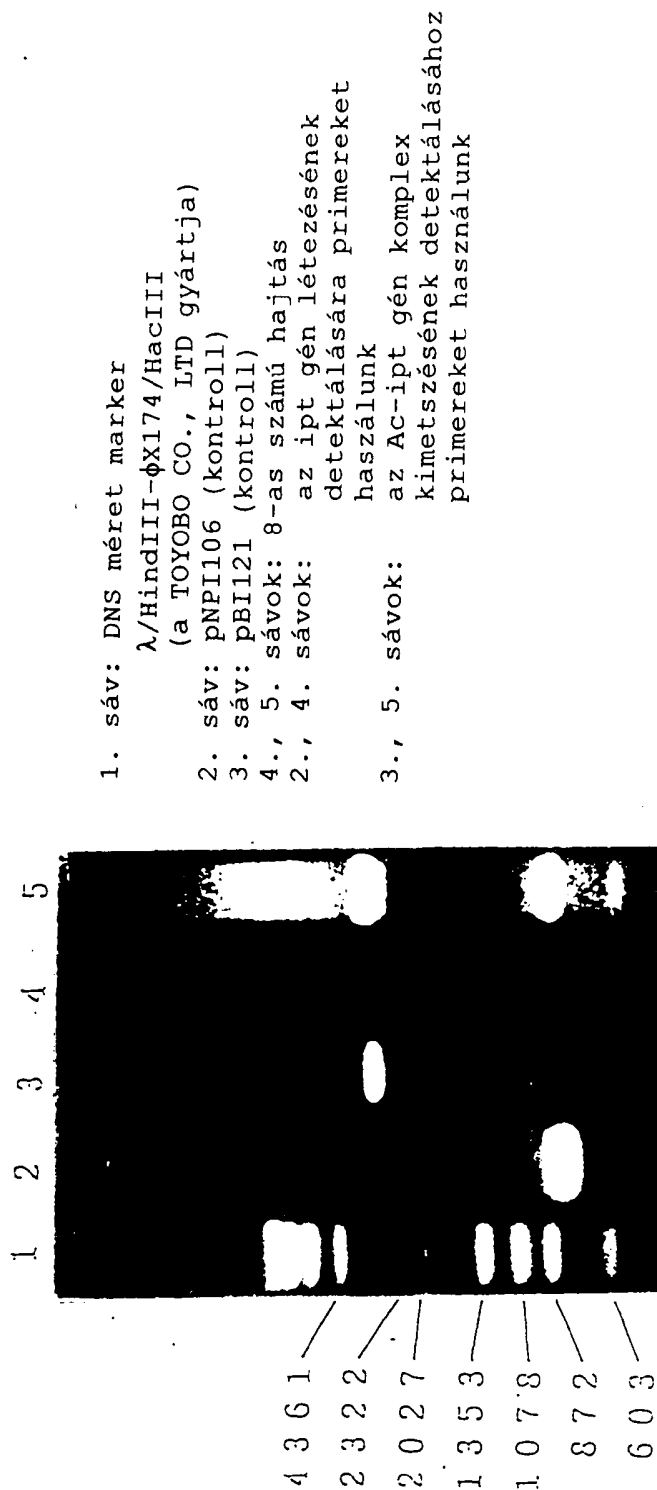


12. ábra



**ifj. Szentpéteri Ádám**  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Nemzetközi  
Szabadalmi Ügynökség  
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323

13. ábra



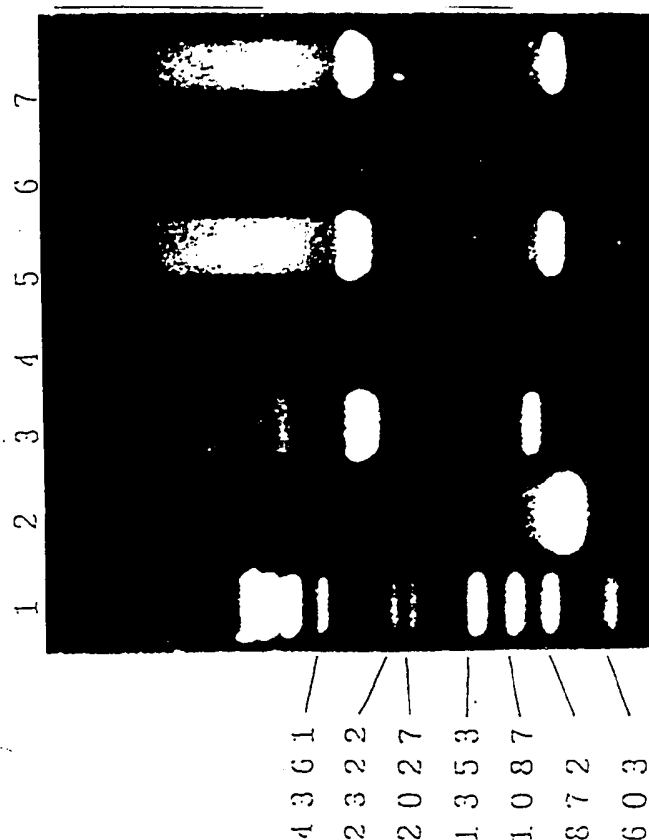
ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323



14 / 29

14. ábra



1. sáv: DNS méret marker

λ/HindIII-φX174/HacIII  
(a TOYOBO CO., LTD gyártja)

2. sáv: pNPI106 (kontroll)

3. sáv: pBI121 (kontroll)

4., 5. sávok: a 13-1 számú hajtásból nyert normális egysejtű

6., 7. sávok: a 14-1 számú hajtásból nyert normális egysejtű

2., 4., 6. sávok: az ipt gén létezésének detektálására primereket használunk

3., 5., 7. sávok: az Ac-ipt gén komplex kimetszésének detektálásához primereket használunk

ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő

az S.B.G. &amp; K. Nemzetközi

Szabadalmi Iroda tagja

H-1062 Budapest, Andrássy út 113.

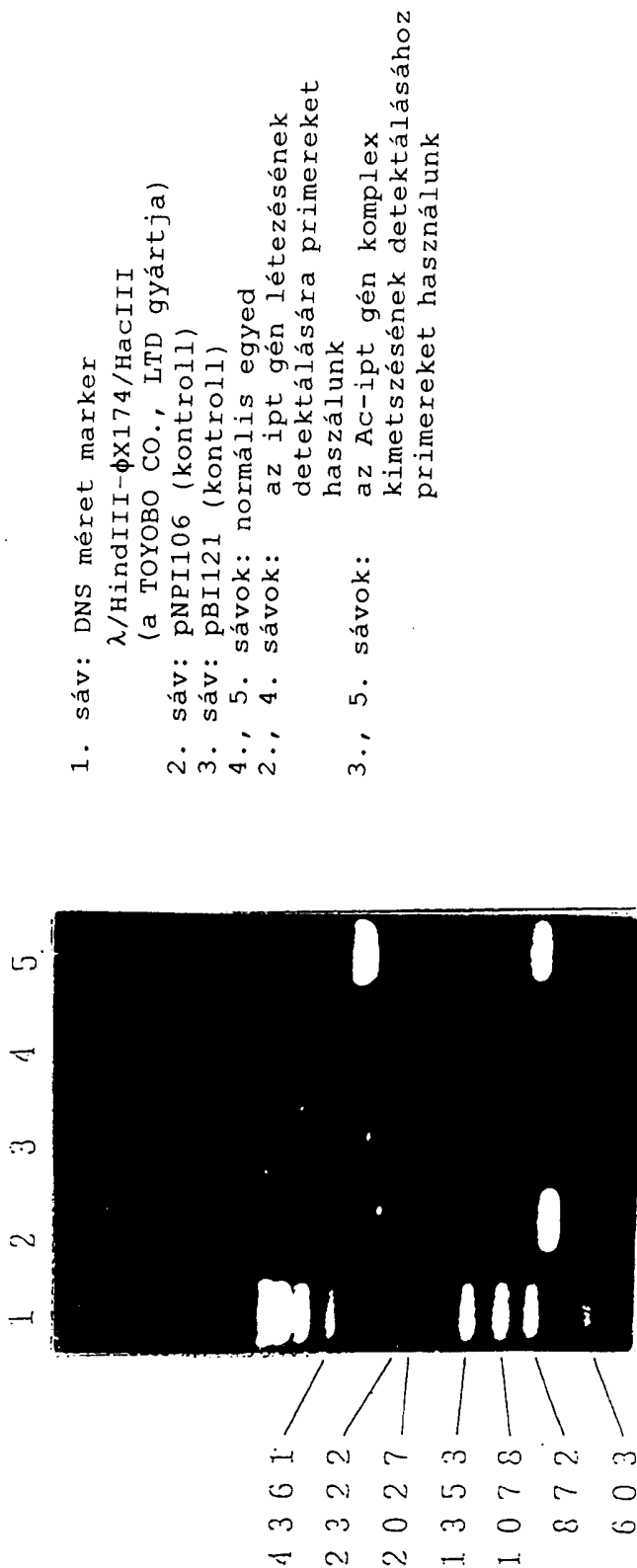
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323



15. ábra



16. ábra



Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő

B.G. &amp; K. Nemzetközi

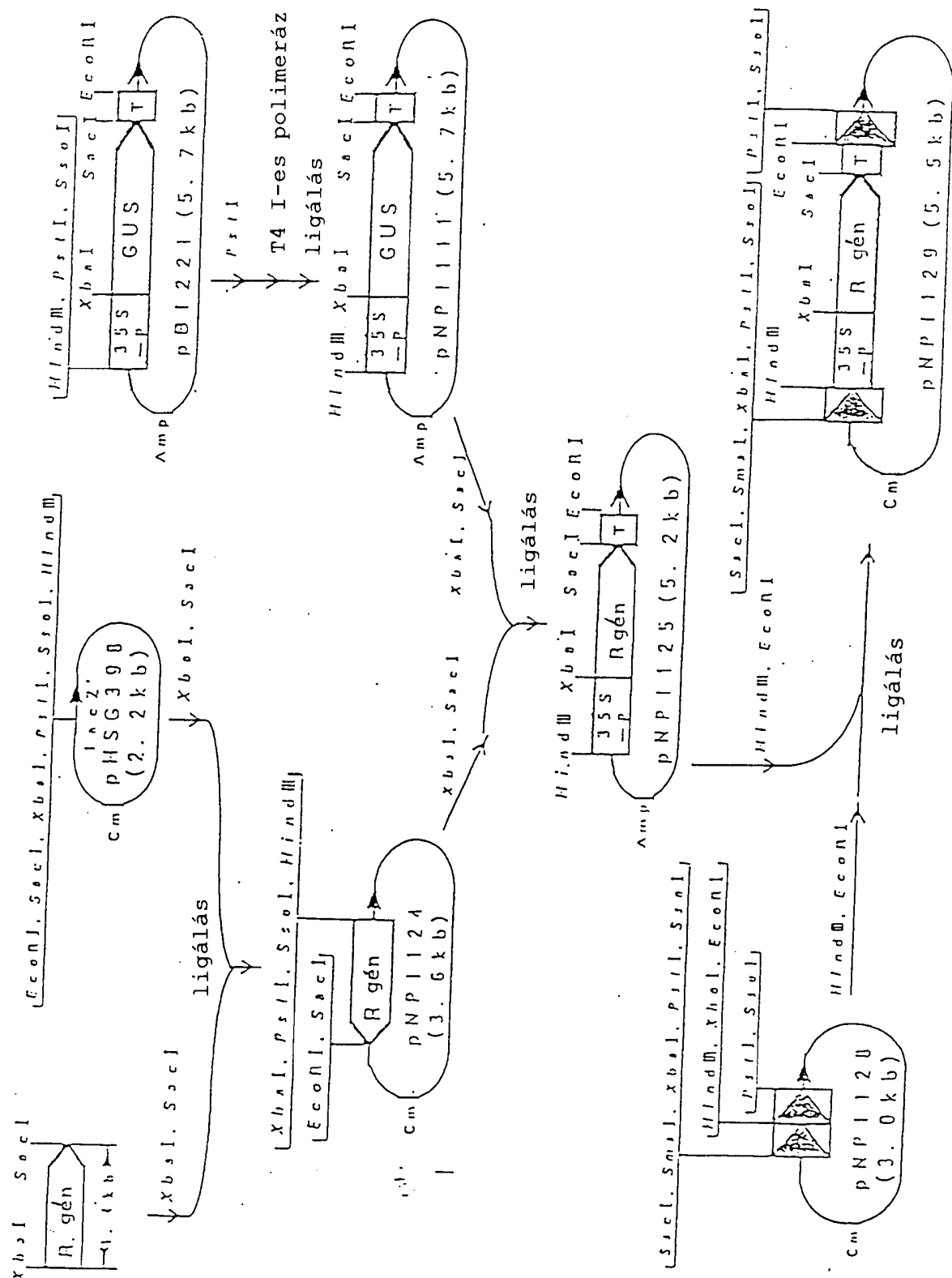
Szabadalmi Iroda tagja

1065 Budapest, Andrásy út 113.

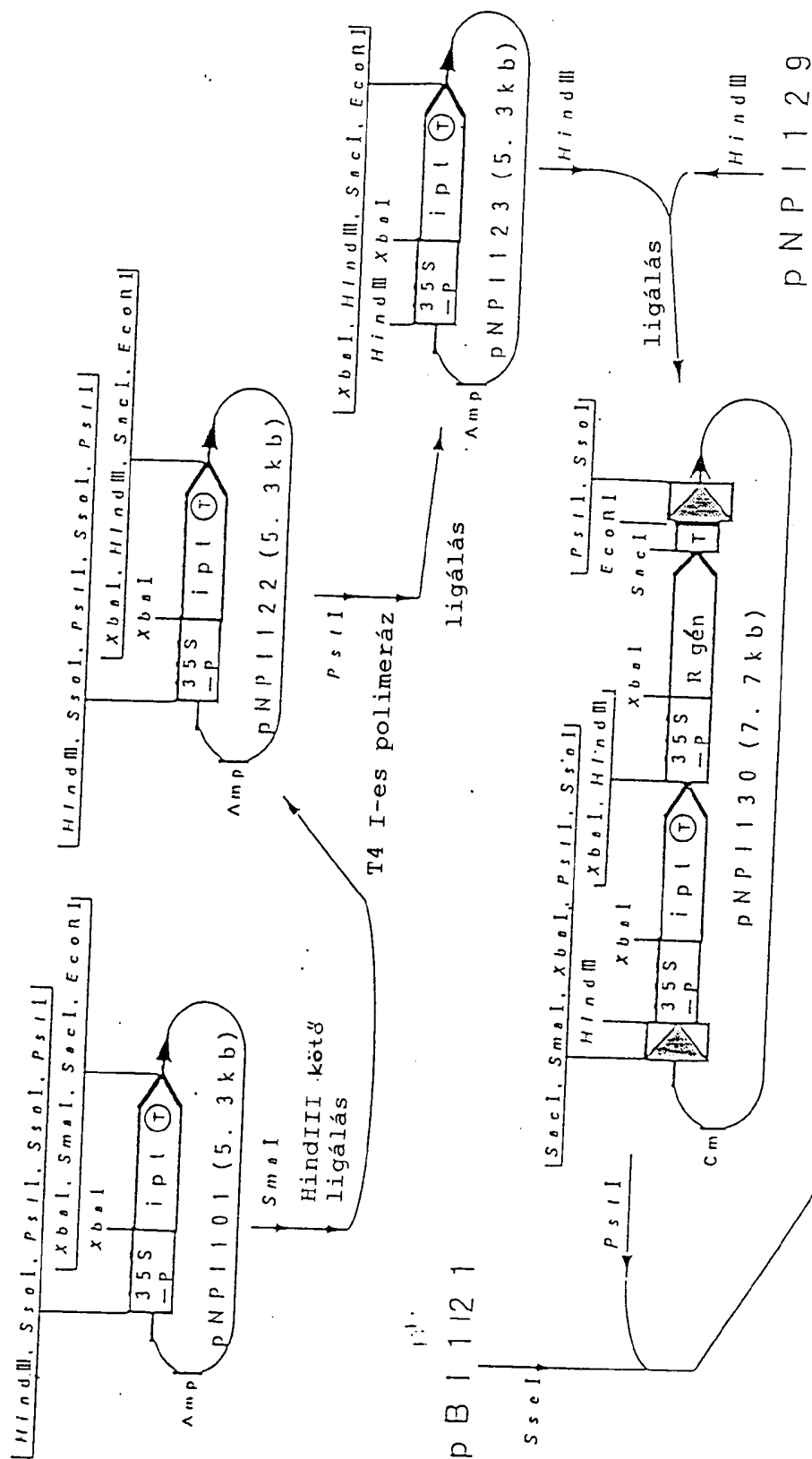
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323



18. ábra

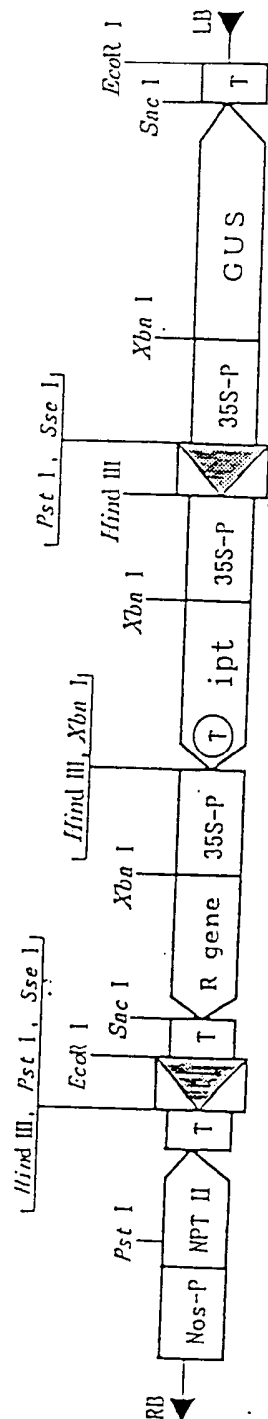


19. ábra



pNP 1132 (18.5 kb)

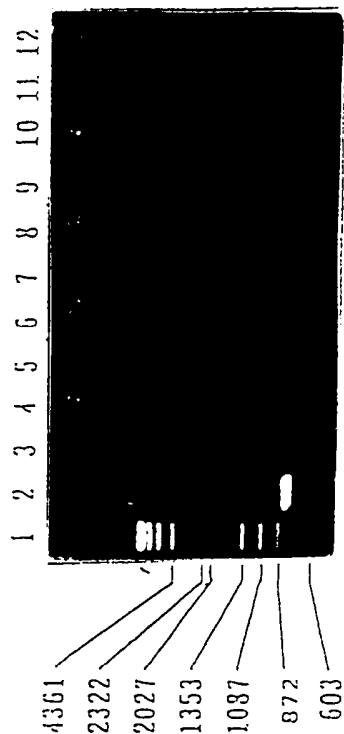
20. ábra



pNPI 132 (18.5 kb)

## 21. ábra

Az ipt gén detektálására  
szolgáló primerek használata



1. sáv: DNS méret marker

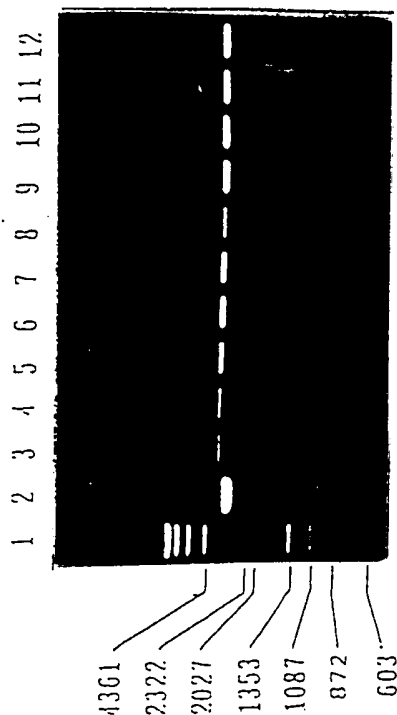
λ/HindIII-φX174/HacIII  
(a TOYOBO CO., LTD gyártja)

2. sáv: pNPI132 (kontroll)

|                          |                     |       |
|--------------------------|---------------------|-------|
| 3. sáv: 15. számú sáv -  | 1-es számú normális | egyed |
| 4. sáv: 15. számú sáv -  | 2-es számú normális | egyed |
| 5. sáv: 16. számú sáv -  | 1-es számú normális | egyed |
| 6. sáv: 17. számú sáv -  | 1-es számú normális | egyed |
| 7. sáv: 18. számú sáv -  | 1-es számú normális | egyed |
| 8. sáv: 19. számú sáv -  | 1-es számú normális | egyed |
| 9. sáv: 19. számú sáv -  | 2-es számú normális | egyed |
| 10. sáv: 20. számú sáv - | 1-es számú normális | egyed |
| 11. sáv: 20. számú sáv - | 2-es számú normális | egyed |
| 12. sáv: 21. számú sáv - | 1-es számú normális | egyed |

## 22. ábra

Az ipt gént tartalmazó és az Rs-ek által tartott régió kimetszésének detektálására szolgáló primerek használata



1. sáv: DNS méret marker  
λ/HindIII-φX174/HacIII  
(a TOYOBO CO., LTD gyártja)
2. sáv: pBI121 (kontroll)
3. sáv: 15. számú sáv - 1-es számú normális egyed
4. sáv: 15. számú sáv - 2-es számú normális egyed
5. sáv: 16. számú sáv - 1-es számú normális egyed
6. sáv: 17. számú sáv - 1-es számú normális egyed
7. sáv: 18. számú sáv - 1-es számú normális egyed
8. sáv: 19. számú sáv - 1-es számú normális egyed
9. sáv: 19. számú sáv - 2-es számú normális egyed
10. sáv: 20. számú sáv - 1-es számú normális egyed
11. sáv: 20. számú sáv - 2-es számú normális egyed
12. sáv: 21. számú sáv - 1-es számú normális egyed

ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő

az S.B.G. & K. Nemzetközi

Szabadalmi Iroda tagja

H-1062 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: 34-24-930; Fax: 34-24-323



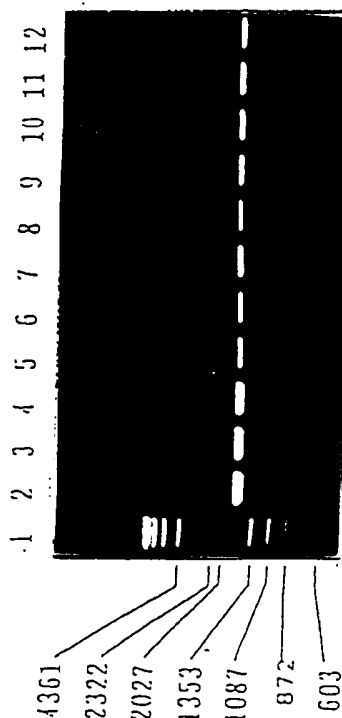
# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

23 / 29

23. ábra

A GUS gén létezésének  
detektálására szolgáló  
primerek használata

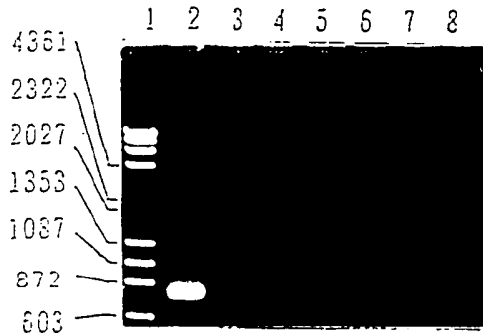
1. sáv: DNS méret marker  
λ/HindIII-φX174/HacIII  
(a TOYOBO CO., LTD gyártja)
2. sáv: pNPI132 (kontroll)
3. sáv: 15. számú sáv - 1-es számú normális egyed
4. sáv: 15. számú sáv - 2-es számú normális egyed
5. sáv: 16. számú sáv - 1-es számú normális egyed
6. sáv: 17. számú sáv - 1-es számú normális egyed
7. sáv: 18. számú sáv - 1-es számú normális egyed
8. sáv: 19. számú sáv - 1-es számú normális egyed
9. sáv: 19. számú sáv - 2-es számú normális egyed
10. sáv: 20. számú sáv - 1-es számú normális egyed
11. sáv: 20. számú sáv - 2-es számú normális egyed
12. sáv: 21. számú sáv - 1-es számú normális egyed



ifj. Szentpéteri Ádám  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323

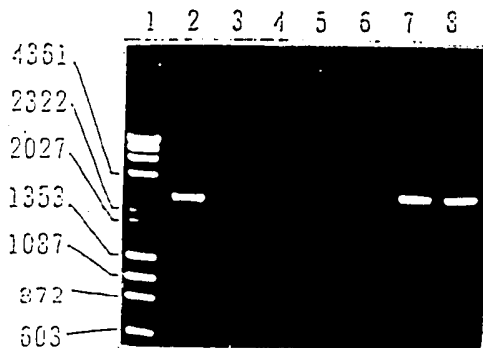
24. ábra

(A) Az ipt gén létezésének detektálására szolgáló primerek használata



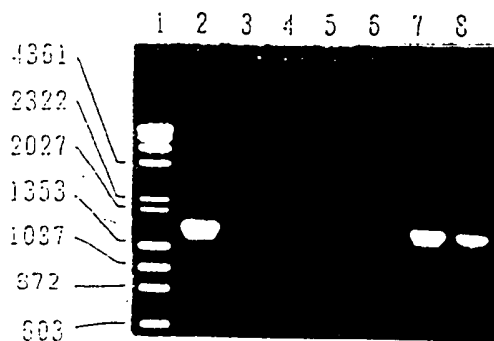
1. sáv: DNS méret marker  
 $\lambda$ /HindIII- $\phi$ X174/HacIII  
(a TOYOBO CO., LTD gyártja)
2. sáv: pNPI132 (kontroll)
3. sáv: nem fertőzött egyed
- 4-6 sávok: kanamicin érzékeny egyed
- 7-8 sávok: kanamicin rezisztens egyed

(B) Az ipt gént tartalmazó és az Rs-ek által tartott régió kimetszésének detektálására szolgáló primerek használata



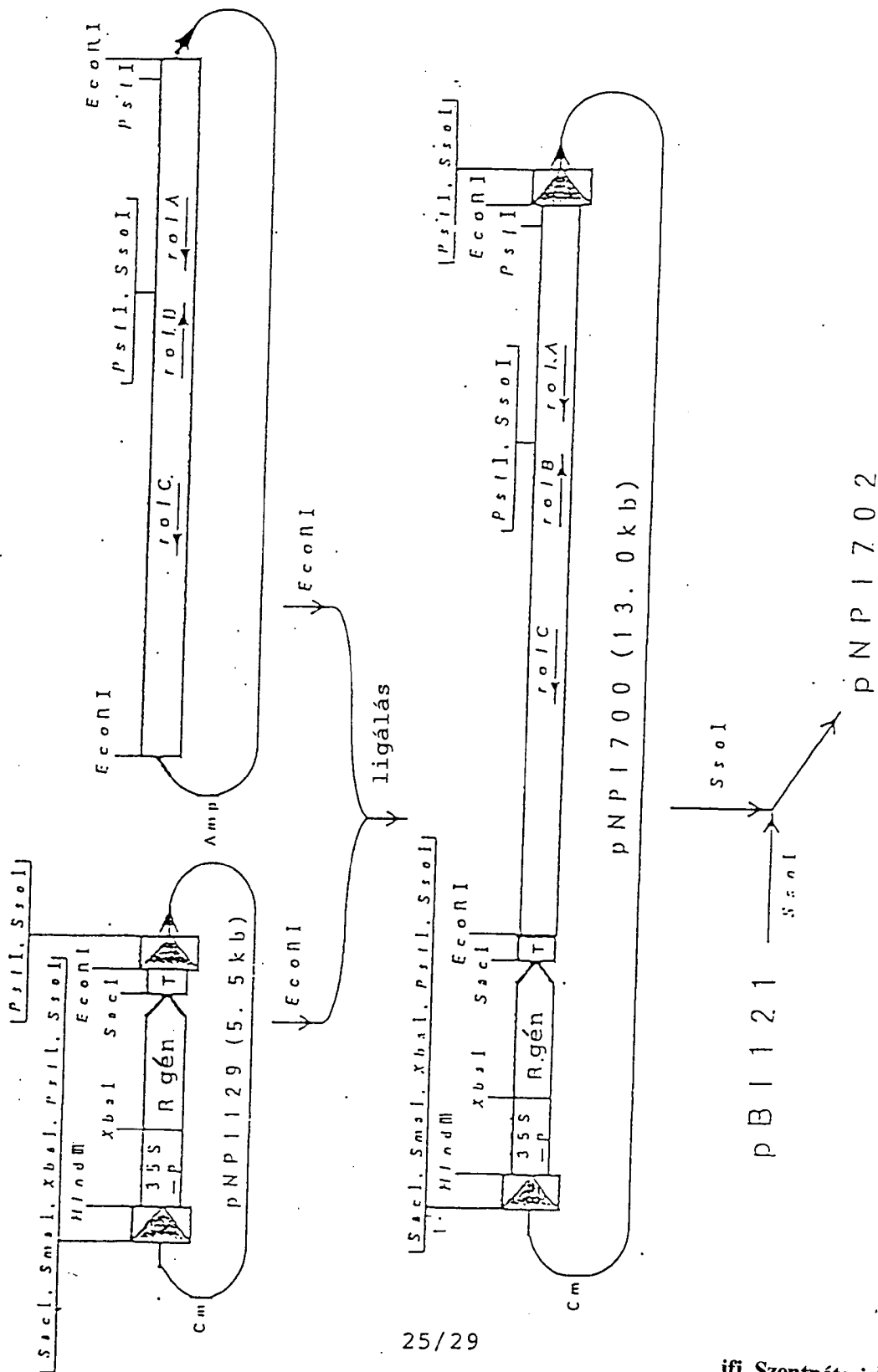
1. sáv: DNS méret marker  
 $\lambda$ /HindIII- $\phi$ X174/HacIII  
(a TOYOBO CO., LTD gyártja)
2. sáv: pBI121 (kontroll)
3. sáv: nem fertőzött egyed
- 4-6 sávok: kanamicin érzékeny egyed
- 7-8 sávok: kanamicin rezisztens egyed

(C) A GUS gén létezésének detektálására szolgáló primerek használata



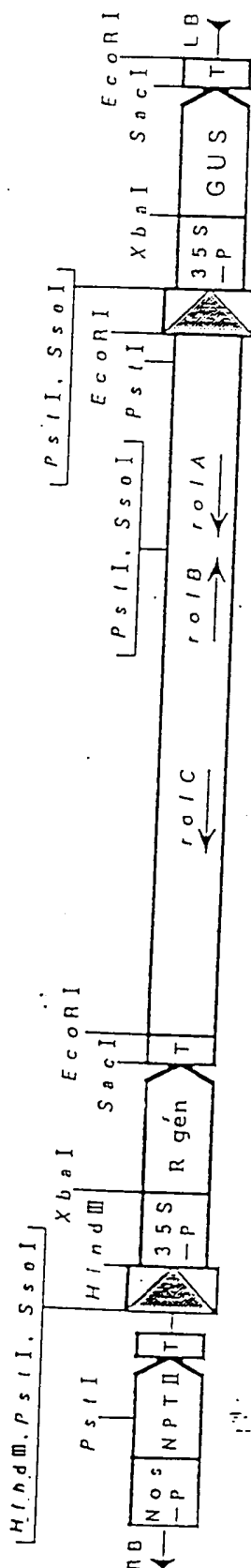
1. sáv: DNS méret marker  
 $\lambda$ /HindIII- $\phi$ X174/HacIII  
(a TOYOBO CO., LTD gyártja)
2. sáv: pNPI132 (kontroll)
3. sáv: nem fertőzött egyed
- 4-6 sávok: kanamicin érzékeny egyed
- 7-8 sávok: kanamicin rezisztens egyed

25. ábra



25/29

## 26. ábra



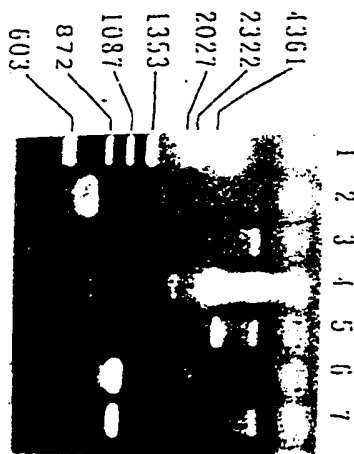
pNP1702 (23.9 kb)

27. ábra



**ifj. Szentpéteri Ádám**  
szabadalmi ügyvivő  
az S.B.G. & K. Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda tagja  
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323





29. ábra

1. sáv: DNS méret marker  
 $\lambda$ /HindIII- $\phi$ X174/HaeIII  
 (a TOYOBO CO., LTD gyártja)
2. sáv: pNP1132 (kontroll)
4. sáv: pNP1139 (kontroll)
6. sáv: pNP1140 (kontroll)
- 3., 5., 7. sávok: a többszörös bejuttatás utáni normális  
 hajtások
- 2., 3. sávok: az ipt gén jelenlétének detektálására szolgáló  
 primerek használata
- 4., 5. sávok: az ipt gént tartalmazó és az Rs-ek által tartott régió  
 kimetszésének detektálására szolgáló primerek  
 használata
- 6., 7. sávok: a HPT gén létezésének detektálására szolgáló primerek  
 használata