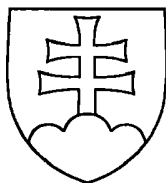


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 23.12.1998
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 9801408.7
(32) Dátum priority: 22.01.1998
(33) Krajina priority: GB
(40) Dátum zverejnenia: 12.02.2001
(86) Číslo PCT: PCT/EP98/08553, 23.12.1998

(21) Číslo dokumentu:

1095-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

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

(71) Prihlasovateľ: UNILEVER NV, Rotterdam, NL;

(72) Pôvodca vynálezu: Jarman Carl Dudley, Sharnbrook, Bedford, GB;
Sidebottom Christopher Michael, Sharnbrook, Bedford, GB;
Twigg Sarah, Sharnbrook, Bedford, GB;
Worrall Dawn, Heslington, York, GB;

(74) Zástupca: Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Mrazuvzdorný proteín, nukleokyselinová sekvencia, mrazený potravinový výrobok s jej obsahom a spôsob jeho získavania**

(57) Anotácia:
Mrazuvzdorný proteín obsahujúci minimálne 40 % aminokyselín zo skupiny S, T alebo N a s minimálne 80 % prekrytím s nasledovnou aminokyselinovou sekvenciou: D-E-Q-P-N-T-I-S-G-S-N-N-T-V-R-S-G-S-K-N-V-L-A-G-N-D-N-T-V-I-S-G-D-N-N-S-V-S-G-S-N-N-T-V-V-S-G-N-D-N-T-V-T-G-S-N-H-V-V-S-G-T-N-H-I-V-T-D-N-N-N-N-V-S-G-N-D-N-N-V-S-G-S-F-H-T-V-S-G-G-H-N-T-V-S-G-S-N-N-T-V-S-G-S-N-H-V-V-S-G-S-N-K-V-V-T-D-A, ako aj príslušné alely. Je opísaný aj mrazený potravinový výrobok s jeho obsahom a spôsob jeho získavania.

Mrazuvzdorný proteín, nukleokyselinová sekvencia, mrazený potravinový výrobok s jeho obsahom a spôsob jeho získavania

Oblasť techniky

Vynález sa týka mrazuvzdorných proteínov (AFPs), nukleokyselinová sekvencia, mrazeného potravinového výrobku obsahujúceho AFPs a spôsobu jeho získavania.

Doterajší stav techniky

Mrazuvzdorné proteíny (AFPs) boli navrhnuté za účelom zlepšenia mrazuvzdorných vlastností potravín.

Pre potreby vynálezu je termín AFP v doterajšej technike dobre známy, ide najmä o tie bielkoviny, ktoré vykazujú inhibičnú aktivitu proti rastu kryštálov ľadu. Ako príklad pozri US 5,118,792.

WO 90/13571 opisuje mrazuvzdorné kryštály vyrábané chemicky alebo rekombinantnými DNA metódami. AFPs môžu byť vhodne použité v potravinových výrobkoch. Príklad 3B ukazuje modifikované tvary ľadových kryštálov ak zmes voda-ľad je zmrazená ako povlak v kombinácii s 0,01 % hmotn. AFP.

WO 92/22581 opisuje AFPs z rastlín, ktoré možno použiť na kontrolu tvaru ľadových kryštálov v zmrzline. Tento dokument tiež opisuje spôsob extrahovania polypeptidových zlúčenín z mimobunkového priestoru rastlín infiltrovaním extrakčného média do listov bez porušenia rastlín.

WO 94/03617 opisuje výrobu AFPs z kvasníc a ich možné použitie v zmrzlínach. WO 96/11586 opisuje AFPs z rýb produkované mikróbami.

Viaceré literárne zdroje uvádzajú izoláciu a/alebo použitie rastlinných proteínov na kryoochranu. Kryoochranné proteíny majú funkciu v ochrane rastlinných membrán proti poškodeniu mrazom. Tieto proteíny však nemajú rekryštalizačné inhibičné vlastnosti a preto nespádajú pod termín AFPs.

Hincha v časopise *Journal of Plant Physiology*, 1992, 140, 236-240 opisuje izoláciu kryoochranných bielkovín z kapusty. Volger v *Biochimica et Biophysica Acta*, 412 (1975), 335-803 opisuje izoláciu kryoochranných listových bielkovín zo špenátu. Boothe v *Plant Physiol* (1995), 108: 759-803 opisuje izoláciu bielkovín z *Brassica napus*. Opäť sa však tieto proteíny považujú skôr za kryoochranné proteíny ako AFPs. Neven v *Plant Molecular Biology* 21: 291-305, 1993 opisuje DNA charakteristiku kryoochranného proteínu zo špenátu. Salzman v *Abstracts a Reviews* z 18. výročného stretnutia ASEV/Východnej sekcie v *Am. & J. Enol. Vitic.*, Zv. 44, č. 4, 1993 opisuje prítomnosť varu odolných polypeptidov v púčikoch *Vitis*. Hoci proteíny sú analogické s mrazuvzdornými proteínmi rýb, sú to kryoochranné proteíny, a nie AFPs. Lin v *Biochemical and Biophysical Research Communication*, Zv. 183, č. 3, 1992, str. 1103-1108 a v Lin, *Plant Physiology* (1992) 99, 519-525 opisuje 15 kDa kryoochranný proteín z *Arabidopsis thaliana*. Houde v *Plant Journal* (1995) 8 (4), 583-593 uvádza kryoochranné proteíny z pšenice.

Avšak použitie AFPs sa doteraz neuplatnilo pre komerčne dostupné potravinové výrobky. Jednou z príčin sú vysoké náklady a komplikovaný spôsob získavania AFPs. Ďalšou príčinou je, že AFPs, ktoré boli doteraz navrhované na použitie v potravinových výrobkoch nemôžu byť začlenené do štandardnej zmesi výrobku, pretože majú tendenciu byť nestabilné počas spracovávania, najmä počas pasterizácie. Túto destabilizáciu podľa všetkého spôsobuje denaturácia AFPs, čo je známy efekt bežne pozorovaný u peptidov a proteínov.

V nezverejnenej patentovej prihláške PCT/EP97/03634 bolo opísané, že AFPs môžu byť izolované z prírodných zdrojov, ako napríklad z trávy aklimatizovanej na chlad, a to relatívne jednoduchým spôsobom. Tento spôsob na prvý krát vedie k identifikácii AFPs, ktoré možno vhodne začleniť do zmesi na prípravu mrazených výrobkov pred ich pasterizáciou.

Tento spôsob získavania AFPs z trávy zahŕňa nasledovné kroky:

- a) izolovanie šťavy obsahujúcej AFP z trávy;
- b) tepelné spracovanie trávy alebo šťavy obsahujúcej AFP na teplotu najmenej 60 °C;
- c) odstránenie nerozpustných frakcií.

Krok c uvedeného spôsobu zvyčajne nasleduje po krokoch a a b. Kroky a a b možno uskutočniť v akomkoľvek poradí, napríklad krok a môže byť uskutočnený pred krokom b (v takom prípade sa zohreje šťava bohatá na AFP) alebo krok b predchádza kroku a (v takom prípade sa zohreje prírodný zdroj) alebo kroky a a b sa uskutočnia súčasne.

Tento spôsob má veľa výhod. Po prvé, použitím tohto spôsobu už nie je potrebné vyhnúť sa porušeniu trávy, ako je to požadované v spôsoboch podľa WO 92/22581. To významne zvyšuje komerčné využitie spôsobu, napríklad v porovnaní s WO 92/22581, pretože už nie je potrebné vynakladať toľko prostriedkov na špecifické spracovanie. Použitím vysokých teplôt sa zdá byť možné extrahovať z veľkej skupiny peptidov prítomných v tráve AFP, ktorý je veľmi aktívny s ohľadom na inhibičné vlastnosti rekryštalizácie ľadu. Po tretie, napriek očakávaniam použitie vysokých teplôt nedenaturuje všetok proteínový materiál, ale zdá sa, že denaturuje len niektoré proteíny, zatiaľ čo ostatné AFP v tráve majú zlepšenú teplotnú stabilitu. To umožňuje zahrnúť do prípravkov izolované AFPs, ktoré musia byť vystavené vyššej teplote, napríklad v kroku pasterizácie. Toto je zvlášť prekvapujúce, pretože napríklad AFPs z WO 92/22581 sa nezdajú byť stabilné pri zohrievaní.

Uvedený spôsob v kroku b zahŕňa zohrievanie trávy alebo šťavy bohatej na AFP na teplotu vyššiu ako 60 °C. Výhodná je teplota od 60 do 110 °C, najvýhodnejšie od 80 do 105 °C. Krok zohrievania sa môže uskutočniť po izolácii šťavy bohatej na proteíny (krok a) alebo pred izoláciou šťavy bohatej na proteíny. Môže byť použitý akýkoľvek vhodný spôsob na zohriatie šťavy, napríklad bežné zohrievanie alebo zohrievanie v mikrovlnnej rúre, prípadne s pridaním extrakčného média, s parením, atď.

Ak sa použije extrakčné médium, výhodne sa použije len malé množstvo, aby sa zabránilo nežiadúcemu rozpúšťaniu AFP frakcie. Môže byť použité akékoľvek vhodné extrakčné médium, ale najvýhodnejšie je použiť vodu. Ak je to žiadúce, do vody sa môžu pridať aditíva pred použitím extrakčného média. Najvýhodnejšie je však použiť vodu bez akýchkoľvek aditív.

Zistilo sa tiež, že uvedeným spôsobom sa môže získať veľmi aktívny AFP odvodený od trávy. Pre účely vynálezu termín tráva zahŕňa zástupcov čeľade

Gramineae, vrátane viacročných tráv, napríklad *Lolium perenne*, *Parapholis strigosa*, *Nardus stricta*, *Catapodium loliaceum* a *Lolium multiflorum*, *Poa trivialis*, *Poa pratensis* a obilniny, ako napríklad zimná raž, zimná pšenica a zimný jačmeň. Prihlasovatelia stanovili sekvenciu aminokyselín tohto AFP.

Prekvapujúco sa zistilo, že veľmi aktívne AFPs, ktoré môžu byť odvodené od rastlín sa vyznačujú vysokou úrovňou aminokyselín: serín (S), treonín (T) a asparagín (N).

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu sú mrazuvzdorné proteíny (AFPs), v ktorých najmenej 40 % aminokyselín v proteíne je spomedzi serínu (S), treonínu (T) a asparagínu (N). Výhodne sú AFPs odvodené z tráv, najmä z čeľade *Gramineae*.

Výhodná molekulová hmotnosť AFPs podľa vynálezu je od 8 do 16 kDa, výhodnejšie od 10 do 14 kDa, kde táto molekulová hmotnosť sa stanovuje z génovej sekvencie alebo hmotnostnou spektrometriou nemodifikovanej formy, napríklad v ne-glykozylovanej forme.

Druhé uskutočnenie vynálezu sa týka AFP, ktorý môže byť odvodený od trávy, pričom aminokyselinová sekvencia tohto AFP na N-konci je nasledovná:

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

Do rozsahu vynálezu tiež patria proteíny so sekvenciou, ktorá sa vyznačuje vysokým stupňom podobnosti k uvedenej sekvencii. Pre účely vynálezu je sú jeho rozsahu zahrnuté všetky RI aktívne proteíny s aminosekvenciou prekrývajúcou sa s uvedenou sekvenciou minimálne z 80 %. Výhodnejšie je prekrytie najmenej 90 %, najvýhodnejšie viac ako 95 %, napríklad také sekvencie aminokyselín, ktoré sa od uvedenej sekvencie líšia buď žiadnou alebo len jednou alebo dvomi aminokyselinami. Do rozsahu sú tiež zahrnuté izoformy uvedených proteínov.

Do rozsahu predloženého vynálezu tiež patria modifikované verzie vyššie opísaných proteínov, kde tieto modifikácie materiálne neovplyvňujú vlastnosti inhibície rekryštalizácie ľadu, ako napríklad glykozylované verzie.

Šťava bohatá na AFP môže byť získavaná z trávy akýmkoľvek výhodným spôsobom, napríklad lisovaním, filtráciou, homogenizáciou, extrakciou, atď. Výhodne sa tráva pred zberaním frakcií bohatých na proteíny, napríklad filtráciou, naseká na menšie kúsky alebo na riedku kašu. Táto macerácia sa môže uskutočniť akýmkoľvek výhodným spôsobom, napríklad v miešačke. Skúsený odborník ľahko dokáže oddeliť materiál v takej forme, aby sa mohol uskutočniť zber šťavy bohatej na proteíny.

Po zbere a zohrievaní (v požadovanom poradí) proteínové frakcie výsledného AFP obsiahnuté vo vzorke sa môžu spracovať akýmkoľvek výhodným spôsobom za účelom odstránenia nerozpustných frakcií a zachovania tekutých frakcií bohatých na AFP. Nerozpustné frakcie sa môžu odstrániť napríklad filtráciou, vyparovaním, atď. Tekutina bohatá na AFP sa môže potom výhodne spracovávať koncentrovaním a izolovaním AFPs vo forme vhodnej na ďalšie použitie. Príkladmi vhodných spôsobov sú sušenie a následné získavanie prášku alebo pasty, ďalšia koncentrácia za účelom získavania AFP koncentráту, chromatografia za účelom oddeľovania AFPs z extrakčného média, atď. Opäť je vecou skúseného odborníka stanoviť vhodné prostriedky a podmienky na vhodnú izoláciu.

Stanovila sa tiež sekvencia nukleových kyselín, ktorá kóduje uvedený AFP. Druhé uskutočnenie vynálezu sa teda týka sekvencie nukleových kyselín schopných kódovať AFPs podľa vynálezu.

Výhodná sekvencia nukleových kyselín je nasledovná:

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

CAC GTT GTA TCT GGA AGC AAC AAA GTC GTG ACA GAC GCT TAA

Do rozsahu predloženého vynálezu sú tiež zahrnuté alelové sekvencie alebo iné sekvencie nukleových kyselín, ktoré sú schopné kódovať vyššie opísané AFPs, napríklad také sekvencie nukleových kyselín, kde v porovnaní s uvedenou sekvenciou bol príslušnými synonymami (t.j. kodónmi kódujúcimi rovnakú aminokyselinu) nahradený len jeden alebo dva kodóny.

Do rozsahu vynálezu sú tiež zahrnuté vektory obsahujúce sekvenciu nukleových kyselín schopných kódovať AFP podľa vynálezu.

Na základe uvedených informácií je tiež možné geneticky modifikovať iné prírodné zdroje tak, aby sa z nich získali výhodné AFPs ako boli opísané vyššie.

Zistilo sa, že AFPs vyššie uvedenej sekvencie zlepšili vlastnosti inhibície rekryštalizácie ľadu. Vhodný test na zistenie vlastností inhibície rekryštalizácie ľadu je opísaný v príkladoch a zahŕňa rýchle zmrazovanie na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následné uskladnenie pri $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ na jednu hodinu. Výhodne AFPs, ktoré sa podrobia tomuto testu po zohriatí majú veľkosť častíc kryštálov ľadu o menej ako $5\text{ }\mu\text{m}$ väčšiu ako veľkosť častíc kryštálov vo vzorke s AFP, ktorá nebola zohriata. Výhodne je rozdiel menší ako $3\text{ }\mu\text{m}$, najvýhodnejšie menší ako $1\text{ }\mu\text{m}$.

Výhodné sú tie AFPs, ktoré majú výrazne vlastnosti inhibície rekryštalizácie ľadu. Vhodný test na stanovenie vlastností inhibície rekryštalizácie ľadu je opísaný v príkladoch. Výhodne AFPs podľa vynálezu majú veľkosť častíc následne po teste na inhibíciu rekryštalizácie (ako je to uvedené v príkladoch) $15\text{ }\mu\text{m}$ alebo menej, výhodnejšie od 5 do $15\text{ }\mu\text{m}$.

AFP podľa vynálezu možno vhodne použiť v potravinových výrobkoch, výhodne v takých potravinových výrobkoch, ktoré sú zmrazené alebo majú tendenciu sa zmrazovať. Veľmi výhodné je použitie AFPs vo výrobkoch, ktoré sa zohrievajú napríklad pasterizáciou, predhrievaním alebo sterilizáciou pred zmrazením. Veľmi výhodné je najmä použitie v mrazených cukrovinkách.

Príkladmi takýchto potravinových výrobkov sú: zmesi mrazených cukrovínok, ako napríklad zmesi smotanových zmrzlín a zmesi ovocných zmrzlín, ktoré sa zvyknú pred zmrazením pasterizovať. Takéto zmesi sa zvyčajne skladujú pri teplote

miestnosti. Vhodnými formami výrobkov sú: práškové zmesi napríklad vo vreckách alebo vrecúškach. Uvedené zmesi môžu byť základom mrazeného potravinového výrobku, napríklad po pridaní vody a prípadných ďalších prísad a voliteľne po prevzdušení.

• Ďalším príkladom vhodnej zmesi by mohla byť tekutá zmes (voliteľne prevzdušená), ktorá môže byť zmrazená po prípadnom pridaní ďalších komponentov a voliteľnom ďalšom prevzdušení.

Jasnou výhodou vyššie opísaných zmesí je, že vďaka prítomnosti AFP môžu byť zmesi zmrazené pri podmienkach v stave kľudu, napríklad v mrazničke v obchode alebo doma, a to bez vytvárania nežiadúcich ľadových kryštálov a teda so štruktúrou odlišujúcou sa od tej, ktorá sa dosahuje pri zmrazovaní v stave kľudu.

Veľmi výhodne sa tieto zmesi balia do uzavretých obalov (napríklad kartónov, tašiek, škatúl, obalov z plastu, atď.). Pri jednotlivých kusoch je veľkosť obalu všeobecne od 10 do 1000 g. Pri viackusových baleniach je výhodná veľkosť obalu do 5000 g. Všeobecne veľkosť obalu je od 10 g do 5000 g.

Ako je uvedené vyššie, výhodnými výrobkami, v ktorých sú použité AFPs, sú mrazené cukrovinky, ako napríklad smotanová zmrzlina alebo ovocná zmrzlina. Výhodne je podiel AFPs od 0,00001 do 0,5 % hmotn. z konečnej hmotnosti výrobku. Ak sa používajú sušené zmesi alebo koncentráty, koncentrácia môže byť vyššia tak, aby bol podiel AFP v konečnom výrobku v rámci uvedeného rozsahu.

• Pre účely vynálezu sa pod pojmom mrazená cukrovinka rozumie mrazený výrobok charakteru cukrovinky s obsahom mlieka, napríklad zmrzlina, mrazený jogurt, šerbet, sorbet, ľadové mlieko a mrazený vaječný krém, ovocné zmrzliny, zmrzliny s mramorovou štruktúrou a mrazené ovocné pyrė. Použitie vo fermentovaných potravinových výrobkoch je pre niektoré prihlášky menej výhodné.

Podiel tuhých častíc v mrazenej cukrovinke (napríklad cukru, tukov, príchutí, atď.) je výhodne viac ako 4 % hmotn., napríklad viac ako 30 % hmotn., výhodnejšie od 40 do 70 % hmotn.

Mrazené cukrovinky podľa predloženého vynálezu možno vyrobiť akýmkoľvek spôsobom vhodným na výrobu mrazených cukrovíniek. Najvýhodnejšie je však úplne zmiešať všetky prísady výrobku pred pasterizáciou a pred začiatkom

zmrazovania. Zmrazovanie môže voliteľne zahŕňať krok vytvrdzovania, napríklad pri teplote -30 °C alebo nižšej.

Príklady uskutočnenia vynálezu.

Príklad 1

Izolácia AFPs najprv zohriatím trávy a následnou izoláciou šťavy bohatej na AFP a izolácia AFP

Zmes trávových pletív (*Poa trivialis*, *Lolia perenne*, *Holcus lanatus*, *Bromus sterilis*) sa zozbierala v januári (priemerná mesačná teplota bola 3,5 °C, čím bola zabezpečená vhodná aklimatizácia rastlín na chlad). Pletivá tráv sa urýchlene preniesli do laboratória na ďalšie spracovanie a starostlivo umyli, aby sa z nich odstránila nečistota.

500 g odrezkov trávy sa umiestnilo do 650 W mikrovlnnej rúry a zohrievalo pri plnom výkone po dobu 5 minút, pričom sa teplota zvýšila na 85 až 100 °C. Odrezky trávy sa potom nechali ochladiť na teplotu miestnosti.

Alternatívne sa odrezky trávy zmiešali s 500 g vriacej vody a zmes sa znovu zohrial na 100 °C a následne varila 10 minút za stáleho miešania a potom nechala vychladnúť na 60 °C.

Po kroku zohrievania sa z odrezkov filtráciou oddelila šťava bohatá na AFP. Masa sa premiešavala 5 minút za prítomnosti rovnakého množstva vody a potom sa prepasírovala cez 3 vrstvy mušelínu.

Kal sa môže vysušiť pri zmrazovaní za účelom odstránenia vody a následne uskladniť. Alternatívne možno kal zmraziť a uskladniť.

Príklad 2

Zmiešaním nasledovných zložiek sa pripravila tekutá predzmes na prípravu zmrzliny:

<u>Zložka</u>	<u>% hmotn.</u>
odstredené mlieko v prášku	10,00
sacharóza	13,00
maltodextrín (MD40)	4,00
karobová guma	0,14
maslový olej	8,00
monoglycerid (palmitát)	0,30
vanilín	0,01
AFP (podľa Príkladu 1*)	0,01 alebo 0 (kontrola)
voda	na vyrovnanie

*Poznámka: AFP sa pridáva ako koncentrovaná roztok AFP vo vode, percento sa týka množstva AFP.

Zložky sa zmiešali pri teplote miestnosti a následne pasterizovali po dobu 60 sekúnd pri 89 °C. Zmes sa asepticky plnila do vreciek s objemom 500 ml, utesnila a uskladnila pri teplote miestnosti.

Zmes sa môže použiť na prípravu zmrzliny šľahaním bežným šľahačom so 70 % výťažkom a následne zmrazením v stave kľudu v bežnej domácej mrazničke.

Po dvoch mesiacoch uskladnenia mal prípravok podľa vynálezu výrazne lepšiu štruktúru ako kontrolná vzorka.

Príklad 3

Vlastnosti inhibície rekryštalizácie ľadu AFP sa dajú zistiť nasledovným spôsobom.

Úroveň sacharózy vo výrobku obsahujúcom AFP sa upravila na 30 % hmotn. zriedením (ak podiel vo vzorke bol na začiatku väčší ako 30 % hmotn.) alebo pridaním sacharózy do 30 % hmotn. (ak jej podiel bol nižší).

Kvapka vzorky s objemom 3 μ l sa kvapla na podložné sklíčko s priemerom 22 mm, ktoré sa potom prikrylo krycím sklíčkom s priemerom 16 mm a zaťažilo hmotnosťou 200 g, aby sa zabezpečila jednotná hrúbka. Okraje sklíčka sa utesnili priesvitným lakom na nechty.

Skličko sa potom umiestnilo na stolček Linkham THM 600 mikroskopu s riadenou teplotou. Stolček sa rýchlo ochladil na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minútu), pričom sa vytvorilo veľké množstvo malých kryštálov. Teplota stolčeka sa potom rýchlo zvýšila na $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minútu) a udržiavala sa na tejto teplote.

Fáza ľadu sa pozorovala pri $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ s použitím Leica Aristoplan mikroskopu. Za účelom zvýraznenia kontrastu ľadových kryštálov sa použilo polarizované svetlo v spojení s lambda platňou. Stav ľadovej fázy (veľkosť ľadových kryštálov) sa zaznamenával 35 mm fotomikrografiou pri $T=0$ a $T=1$ hodina.

Všeobecne možno tento test použiť na akýkoľvek vhodný prípravok obsahujúci AFP a vodu. Všeobecne podiel AFP v takomto testovanom prípravku nie je veľmi rozhodujúci a môže byť napríklad od 0,0001 do 0,5 % hmotn., výhodnejšie od 0,0005 do 0,1 % hmotn., najvýhodnejšie od 0,01 do 0,05 % hmotn., napríklad 0,01 % hmotn.

Na uskutočnenie tohto testu možno použiť akýkoľvek vhodný prípravok obsahujúci AFP a vodu. Všeobecne však nie je nevyhnutné získať AFP v čistej forme. Na praktické využitie by normálne stačilo pripraviť tekutý extrakt alebo šťavu z prírodného materiálu, kde sa môže potom testovať tento extrakt alebo šťava.

Tento spôsob možno aplikovať napríklad na extrakty obsahujúce AFP získané podľa Príkladu 1 s krokom koncentrácie alebo bez neho.

Následne sa merali vlastnosti inhibície rekryštalizácie. Rekryštalizačné vlastnosti sa merali v šťavách obsahujúcich AFP získaných po extrakcii a zohrievaní podľa Príkladu 1.

Zo Silsoe (UK) sa získala tráva neupravená zohrievaním zozbieraná v januári. Extrakt sa centrifugoval 1 hodinu za účelom odstránenia pôdy a nerozpustného odpadu nasledovne: centrifúga Sorvall RC3C, rotor H6000A, teplota $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$, rýchlosť rotora 5000 otáčok za minútu (7268 g).

Vzorka extraktu sa vysušila pri zmrazení za účelom stanovenia celkového obsahu tuhej zložky. Zistilo sa, že tento podiel je 11,48 mg/ml. Vysušený extrakt sa potom rehydratoval 30 % roztokom sacharózy na pôvodnú koncentráciu tuhej zložky. Riedením extraktu podľa potreby s 30 % roztokom sacharózy sa pripravilo niekoľko roztokov.

Aktivita inhibície rekryštalizácie ľadu sa merala použitím vyššie opísaného testu.

Priemerná veľkosť kryštálov z testov inhibície rekryštalizácie z obrázkov pri T=0 a T=1 hodina sa merala použitím analyzéra Zeiss TGA 10. Veľkosť ľadových kryštálov (dĺžka) sa stanovila obkreslením obvodu kryštálov. Maximálna dĺžka každého jednotlivého kryštálu ľadu z dávky zmrzliny bola importovaná do tabuľkového procesora, kde sa analyzovali údaje za účelom zistenia priemernej a štandardnej odchýlky.

Výsledky sú uvedené v nasledovnej tabuľke.

Vzorka	Celkové množstvo tuhej zložky (mg/ml)	Veľkosť kryštálov ľadu (µm)		Rast kryštálov ľadu za 1 hodinu pri -6 °C (µm)
		T=0	T= 1 hodina pri -6 °C	
Nezriedený	11,48	5,2	7,3	2,1
50 % extrakt	5,74	5,5	7,6	2,1
25 % extrakt	2,87	6,3	8,9	2,6
12,5 % extrakt	1,435	6,6	13,1	6,5
6,25 % extrakt	0,7175	8,1	14,7	6,6
3,125 % extrakt	0,359	7,4	17,0	9,6
1,5625 % extrakt	0,179	9,0	20,3	11,3

Tieto výsledky ukazujú rozličné konečné veľkosti kryštálov a zmeny vo veľkosti ľadových kryštálov po 1 hodine pri -6 °C pre rôzne roztoky extraktu trávy. Vidno, že podiel tuhej zložky v extrakte trávy sa môže líšiť, pričom sa stále dosahujú dobré vlastnosti inhibície rekryštalizácie. Výhodne sa uprednostňujú tie

koncentrácie, ktorých výsledkom je veľkosť kryštálov ľadu po 1 hodine 15 mikrometrov alebo menej.

Podobný test sa uskutočnil s extraktom trávy, ktorý bol zohrievaný (10 minút pri 100 °C). Nezistilo sa žiadne zhoršenie vlastností inhibície rekryštalizácie.

Dodatočne sa extrakty z Príkladu 1 testovali s použitím rovnakého testu inhibície rekryštalizácie. Získali sa nasledovné výsledky:

Zohrievanie	Veľkosť ľadových kryštálov v μm	
	T=0	T=1
60 °C 1 hodina	9,6	11,1
10 minút var	9,8	11,3

Tieto výsledky ukazujú, že dokonca aj po zohrievaní extraktu z trávy aklimatizovanej na chlad sa zachovala schopnosť inhibovať rast kryštálov ľadu.

Príklad 4

Semená viacročnej raže (*Lolium perenne*) boli dodané z Barnbrug (UK) Ltd. Semená boli zasadené do 9 palcových (25,4mm x 9) črepníkov s kompostom Levingtons č. 2 a po vyklíčení, zvyčajne medzi 4 a 7 dňom po zasadení, sa rastliny presadili do skleníka na ďalších 7 až 10 dní až kým nevyrástli do výšky približne 15 až 20 cm. Rastliny sa potom premiestnili do studenej miestnosti na aklimatizáciu na chlad. Aklimatizácia trvala 30 dní pri +4 °C s 8 až 16 hodinami svetla/tmy.

Listy aklimatizované na chlad sa posekali a homogenizovali v 50 mM Tris, 10mM EDTA prispôsobenom na požadované pH s koncentrovaným HCl. Homogenizácia trvala 2 x 30 sekúnd v miešači Waring s hmotnostným pomerom tlmivého roztoku a listov 2,5 : 1.

Homogenát sa potom dal do kúpeľa s vriacou vodou na 10 minút a zozbieral cez štyri vrstvy mušelínu. Zozbieraný kal sa ďalej centrifugoval pri 15 000 xg v 8 x 50 ml rotore centrifúgy Sorvall.

Vlastnosti inhibície rekryštalizácie sa testovali spôsobom opísaným v Príklade 3.

Teplotne stabilný extrakt (10 až 15 ml) sa koncentroval približne desaťnásobne v Amicon koncentrátore s použitím PM10 membrány. Vzorky koncentráту s objemom 1 ml sa odsolili na Rýchlom odsoľovacom stĺpci na FPLC separačnom systéme (Pharmacia). Stĺpec sa nechal prebiehať/pôsobiť pri 1 ml/min v 50 mM Tris/Cl, 10mM EDTA, pH 8,5. Zber frakcií (1 ml) sa začal akonáhle sledované O.D. 280 nm začalo stúpať. RI aktívne frakcie sa ponorili do kúpeľa s objemom 3 ml.

RI aktivita sa nanášala na Mono Q (HR5 x 5) stĺpec ekvilibrovaný v rovnakom Tris, pH 8,5 tlmivom roztoku. Prepustený materiál sa zozbieral ako jedna frakcia a stĺpec sa hneď eluoval lineárnym gradientom 0 až 0,25 M NaCl po dobu 25 minút pri 1 ml/min. Zvyčajným spôsobom sa zistilo, že celková aktivita je neviazaná a eluuje výlučne v prepustenej frakcii.

Použitím 1 mikrolitrových kvapiek 4M NaOH sa opätovne upravilo pH prepustenej frakcie na 9,5, ktorá sa potom naniesla na Mono Q stĺpec a ten sa znovu ekvilibroval v Tris tlmivom roztoku s pH 9,5. Prepustený materiál sa zozbieral ako jedna frakcia a potom sa stĺpec ihneď eluoval s 0 až 0,25 M NaCl lineárnym gradientom po dobu 25 minút. Rýchlosť prietoku bola 1 ml/min a 1 ml frakcie sa zozbierali na RI test. Zistilo sa, že celá aktivita bola viazaná na stĺpec a v prepustenej frakcii sa nezistila žiadna aktivita. Aktivita eluovala ako jeden vrchol medzi 0,08 a 0,14M NaCl.

Aktívne vrcholové frakcie z Mono Q stĺpca sa ponorili do kúpeľa, koncentrovali na 50 mikrolitrov na PM10 Centricon koncentrátore a naniesli na Sephadex 75 stĺpec na Smart systéme (Pharmacia). Stĺpec sa ekvilibroval v 50 mM Tris/Cl pH 9,5 tlmivom roztoku a rýchlosť prietoku bola 50 mikrolitrov/min. Zber vzoriek sa posunul pre 1 mikroliter prázdneho objemu stĺpca a potom sa zozbierali 50 ml frakcie. Aktívne frakcie sa nechali prebiehať/pôsobiť na SDS PAGE.

Vzorky sa nechali prebiehať/pôsobiť na 10% Page géloch z Novexu. Vzorky a gélový tlmivý roztok sa pripravili spôsobom opísaným v návode od výrobcu a gély sa farbili s použitím striebornej farbiacej sady Novex. Aktívne frakcie obsahovali jediný zafarbený proteínový pás so zjavnou molekulovou hmotnosťou 29 kDa.

Proteínové vzorky sa tiež separovali SDS PAGE, a potom nasledoval elektroblotovanie na PVDF membráne založené na spôsobe podľa Matsudaira v 10 mM CAPS tlmivého roztoku, s pH 11,0, 10 % metanol. Membrána sa namočila v metanole a potom ekvilibrovala v Caps tlmivom roztoku po dobu 10 minút. Sanie trvalo 16 hodín pri stabilnom napätí 20 V. Po saní sa proteíny zviditeľnili farbením membrány s 0,2% coomassieovou brilliantovou modrou v 50% metanole, 1% kyseline octovej po dobu 1 minúty. Membrána sa potom odfarbila s 50% metanolom, až kým sa proteínové pásy úplne nezviditeľnili. Membrána sa premyla v Milli Q vode, vysušila vzduchom a uskladnila pri -20 °C.

N-koniec pásu s molekulovou hmotnosťou sa sekvenoval nasledovnými bežnými spôsobmi, čím sa získala nasledovná sekvencia aminokyselín:

Proteín s molekulovou hmotnosťou 29 kDa, s predpokladanou toleranciou k varu a IR aktivitou sa znehybnil na PVDF membráne po separácii SDS PAGE a podrobil sa proteínovému sekvenovaniu amino-konca a 15 z prvých 17 zvyškov sa úspešne sekvenovalo. Proteín s molekulovou hmotnosťou 27 kDa izolovaný z *Poa pratensis* sa tiež sekvenoval na N-konci (Tabuľka 1) a zistilo sa, že má podobnú sekvenciu, z čoho sa dá usudzovať, že je z rovnakej skupiny proteínov. Z toho vyplýva, že u čeľade *Gramineae* existuje jediná skupina AFPs zodpovedných za toleranciu k varu a RI aktivitu.

Tabuľka 1

Usporiadanie sekvencií N-konca proteínu tolerantného k varu a RI aktívneho, s molekulovou hmotnosťou 29 kDa z *Lolium perenne* a proteínu s molekulovou hmotnosťou 27 kDa z *Poa pratensis*

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

Príklad 5

Po prvotnej extrakcii so zmesou fenolu a chloroformu v pomere 1 : 1 nasledovala extrakcia chloroformom. Fenol denaturuje proteíny exponovaním

rezíduí hydrofóbných aminokyselín a umožnením delenia výhodne na organickú fázu. Hydrofilnejšie nukleové kyseliny a uhľovodíky sa delia na vodnú fázu. Proteíny s výrazným stupňom glykozylácie sa tiež môžu deliť na rozhranie. Chloroform je prítomný, keďže proteín sa delí efektívnejšie pri použití dvoch rozličných organických rozpúšťadiel a konečná extrakcia chloroformu odstráni akékoľvek zvyšné pozostatky fenolu.

Teplotne stabilný extrakt pripravený z listov rastlín *Lolium perenne* sa koncentroval približne desaťnásobne s použitím Amicon ultrafiltračnej komory s 10 kDalton uzavretou membránou. Výsledný koncentrát sa naniesol na Superdex 75 PC 3,2/30 gélový filtračný stĺpec prebiehajúci/pôsobiaci na mikroseparačnom systéme Smart (Pharmacia). Stĺpec sa eluoval s 50 mM Tris/Cl tlmivým roztokom s pH 9,5 pri rýchlosti prietoku 0,05 ml/min a zozbierali sa 0,05 ml frakcie. Frakcie sa testovali na aktivitu inhibície rekryštalizácie ľadu a najaktívnejšie frakcie sa spoločne ponorili do kúpeľa. Tieto frakcie sa potom naniesli na Mono Q PC 1,6/5 stĺpec, ekvilibrovali v 50 mM Tris/Cl tlmivom roztoku s pH 9,5 a tiež sa nechali prebiehať/pôsobiť na systéme Smart pri rýchlosti prietoku 0,1 ml/min. Po nanášaní a premývaní sa stĺpec eluoval s lineárnym gradientom 0 až 0,4 NaCl a zozbierali sa 0,1 ml frakcie. Frakcie sa testovali a aktivita eluovala ako jediný vrchol pri približne 0,1M NaCl.

Aktívne frakcie sa nechali víriť v rovnakom objeme fenolu:chloroformu:izo-amyľ alkoholu (1:1 [24:1]) po dobu 1 minúty, potom sa centrifugovali pri 13 000 x g po dobu 30 minút. Vodná (hore) a organická (dole) fáza sa zozbierala oddelene, nebolo pozorované žiadne rozhranie. Obe fázy sa potom nechali vyzrážať pridaním desiatich dielov studeného acetónu a udržiavali pri -20 °C po dobu 16 hodín. Výsledné pelety sa resuspendovali v 50 mM Tris/Cl tlmivom roztoku, testovali na RI aktivitu a nechali prebiehať/pôsobiť na SDS PAGE.

Testovanie resuspendovaných frakcií ukázalo, že RI aktivita sa úplne delí do vodnej fázy. V organickej fáze nebola žiadna RI aktivita dokonca ani po denaturovaní/renaturovaní frakcií v 6 M hydrochloridu guanidínu. Toto bol nečakaný výsledok, pretože proteíny by sa mali deliť do organickej fázy, alebo glykoproteín do rozhrania. Avšak analýza SDS PAGE ukázala, že hoci väčšina proteínov bola v

organickej fáze, jeden proteínový pás so zjavnou molekulovou hmotnosťou 29 kDa bol viditeľný v aktívnej vodnej frakcii, ale chýbal v organickej fáze. Pás mal sfarbenie odlišné od ostatných proteínov a bol veľmi rozptýlený.

Podobná extrakcia fenol:chloroform sa uskutočnila na extrakte tolerantnom k varu pripravenom z listov trávy *Poa pratensis* var *Barcelona* aklimatizovaných na chlad. Táto extrakcia tiež ukázala prednostnejšie delenie RI aktivity do vodnej fázy a proteín mal zjavnú molekulovú hmotnosť 27 kDa na SDS PAGE.

Sekvenovanie proteínu na N-konci proteínov potvrdilo, že sú identické s AFP opísanými v Príklade 4.

Príklad 6

Degenerovaný oligonukleotidový primer (Lol 1) sa vytvoril a syntetizoval z N-konca sekvencie proteínu (ASP-GLU-GLN-PRO-ASN-THR-ILE), ako GAYGARCARCCIAAYACIAT, kde y =C+T, R=A+G a I=inozín.

Prvý pás cDNA sa pripravil z RNA z 5µg 30-dňových listov *Lolium perenne* aklimatizovaných na chlad s použitím Superscript reverznej transkriptázy (Stratgene) a oligonukleotidového primeru OG1 (GAGAGAGGATCCTCGAG (t) 15) podľa návodu od výrobcu. 1 % prvého pásu sa použilo ako templát, spolu s Lol1 a OG1 primérmí, v PCR reakciách. Reakcie sa uskutočnili v termálnom cyklovači s použitím Taq DNA polymerázy (Gibco BRL) po 30 cyklov (1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 55 °C a 1 minúta pri 72 °C) po prvej denaturácii po dobu 2 minút pri 94 °C.

PCR výrobok s 600 bp sa zväčšil a následne čistil z 1 % agarózového gélu a klonoval na pTAg vektor (R&D systémy) podľa návodu od výrobcu. Klonovaný PCR výrobok sa sekvenoval na automatickom zariadení na sekvenovanie DNA Perkin Elmer (Applied Biosystems) s použitím T3 a T7 primerov. Obsahoval otvorenú čítaciu konštrukciu dosť podobnú nasledovnej:

GAT GAA CAG CCG AAT ACG ATT TCT GGG AGC AAC AAT ACT GTC AGA
TCC GGG AGC AAA AAT GTT CTT GCT GGG AAT GAC AAC ACC GTC ATA

TCT GGG GAC AAC AAT AGT GTG TCT GGG AGC AAC AAC ACT GTC GTA
AGT GGG AAT GAC AAT ACC GTA ACC GGC AGC AAC CAT GTC GTA TCA
GGA ACA AAC CAT ATC GTT ACA GAC AAC AAC AAT AAC GTA TCC GGG
AAC GAT AAT AAT GTA TCC GGG AGC TTT CAT ACC GTA TCC GGG GGG
CAC AAT ACT GTG TCC GGG AGC AAC AAT ACC GTA TCT GGG AGC AAC
CAC GTT GTA TCT GGA AGC AAC AAA GTC GTG ACA GAC GCT TAA

a dedukovaná aminokyselinová sekvencia sa dosť podobala nasledovnej:

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

Otvorená čítací rámec kóduje proteín s molekulovou hmotnosťou 12 kDa, ktorá je značne nižšia ako molekulová hmotnosť 29 kDa na SDS PAGE. Pozorovalo sa tiež, že kódovacia sekvencia obsahuje 6 rozpoznateľných glykozylačných miest (ASN-X-SER/THR) a značné množstvo SER a THR rezíduí, ktoré môžu byť tiež glykozylované. Z toho by vyplávalo, že pôvodný proteín izolovaný a *Lolium* je vysoko glykozylovaný. Avšak proteín, ktorý bol enzymaticky deglykozylovaný si stále zachováva aktivitu inhibície rekryštalizácie ľadu, z čoho vyplýva, že glykozylácie nie je nevyhnutná na to, aby bol proteín aktívny.

Príklad 7

Za účelom dokázania, že cDNA z *Lolium perenne* opísaná v Príklade 6 kóduje AFP sa uskutočnila expresia kódovacej oblasti. Vytvoril sa kmeň metylotrofickej kvasnice *Pichia pastoris* obsahujúci *Lolium* AFP cDNA.

Lolium cDNA sa klonovala na pPIC9 vektor s α - faktor signalovou sekvenciou za účelom zabezpečenia sekrécie z bunky a glykozylácie. Všetky enzýmy boli z Boehringer Mannheim a použili sa podľa návodu od výrobcu. Konštrukcia vyjadrovacích vektorov, transformácia a rast *Pichia* boli opísané v príručke Invitrogen Pichia Expression Kit (Version B).

Lolium cDNA sa klonovala na pPIC9 vektor ako PCR amplifikačný fragment s kompatibilnými reštrikčnými koncami na ligáciu na pPIC9 vektor, ktorá sa vyrobil s použitím cDNA ako templátu a primerov

GTATCTCGAGAAAGAGATGAGCAGCCGAACAACGATT a

TTAATTCGCGGCCGCCTGTAGGAAAAGTATGGTATATC, ktorými sa začínalo XhoI reštrikčné miesto na 5' konci a NotI reštrikčné miesto na 3' konci amplifikačného fragmentu a ktoré zabezpečovali, že *Lolium* cDNA bola v rámci sekrečnej signálovej otváracej čítacej konštrukcie. Reakcie sa uskutočnili v termálnom cyklovači s použitím Taq DNA polymerázy a Pfu dokazovacieho čítacieho enzýmu (Boehringer Mannheim) po 30 cyklov (1 minúta pri 94 °C, 1 minúta pri 55 °C a 1 minúta pri 72 °C). Všetky následné PCR reakcie sa uskutočnili pri rovnakých podmienkach, ale bez Pfu enzýmu. XhoI/NotI cDNA fragment sa potom klonoval na XhoI/NotI vylúhovaný pPIC 9 vektor a transformoval do kompetentných *E. Coli* buniek (kmeň XL1-modrý). Po transformácii sa umiestnili na LB platne s 50 µg ml ampicilínu a nechali rásť 16 hodín pri 37 °C. Potom sa transformanty rezistentné na ampicilín zozbierali a analyzovali na integráciu *Lolium* cDNA prostredníctvom PCR s použitím 5' AOX1 a 3' AOX1 primerov, ktoré boli syntetizované ako je to opísané v príručke Invitrogen Kit Manual.

Plazmidová DNA sa izolovala zo štyroch pozitívnych transformantov pomocou miniprep a linearizované vylúhovaním s SalI na transformáciu do buniek *Pichia*, ktoré boli vypestované a premyté ako je to opísané v Invitrogen Manual. Linearizovaná DNA po vylúhovaní bola elektroporovaná do buniek *Pichia* s použitím BioRad GenePulser podľa odporúčania a po pridaní ľadovo vychladeného 1 M sorbitolu bola rozotrená na MD platne, kde pri 30 °C po dobu 24 hodín vyrastali kolónie, až kým sa nestali viditeľné. 16 transformantov sa potom zozbieralo na čerstvé MM a MD platne a transformanty, ktoré rástli normálne na MD platniach, ale pomalšie na MM platniach sa vyseletovali. Tieto transformanty sa potom analyzovali pomocou PCR s použitím 5' a 3' AOX1 primerov a 8 pozitívnych sa testovalo na expresiu.

Najprv sa kolónie inokulovali na BMGY médium a nechali rásť 24 hodín pri 30 °C, potom sa bunky oddelili a preniesli na BMMY médium, kde sa indukovala

expresia a vrátili do 30 °C na ďalších 24 hodín. Po 24 a 48 hodinách sa pridal metanol do 0,5 % za účelom zachovania indukcie. Bunky sa potom odstránili centrifugáciou a alikvotná časť média sa upravila tak, aby obsahovala 30 % sacharózy a potom sa testovala aktivita inhibície rekryštalizácie ľadu. Médium všetkých transformantov sa vyznačovalo výraznou RI aktivitou, zatiaľ čo médium vyrobené rovnakým spôsobom z kontrolnej *Pichia* bez integrovanej *Lolium* cDNA nebolo aktívne vôbec.

Z uvedených príkladov vyplýva, že proteín izolovaný z *Lolium perenne* a príslušná cDNA predstavujú RI aktívny AFP.

Príklad 8

E. coli XL-1 modrá bola použitá pri všetkých krokoch klonovania; kultúry sa pestovali na 2YT médiu s ampicilínom alebo kanamycínom podľa výberu. Všetky oligonukleotidové primery sa syntetizovali na syntetizéri Perkin Elmer 381A DNA s použitím fosforamidovej metódy v súlade s odporúčaním výrobcov. Platne s mladou kultúrou sa pripravili umiestnením 2 ml bunkovej suspenzie *Nicotiana bethiana* na Petriho misku s obsahom 25 ml MS solí, B5 vitamínov (1 mg L kyseliny nikotínovej, 1 mg L pyridoxínu, 10 mg L tiamínu, 100 mg L inozitolu) + 1 mg L 2-4D, 0,2 mg L BAP & 0,8 % agaru. Bunky sa potom rozptýlili tak, aby pokrývali celý agar a potom prikryli sterilným filtračným papierovým diskom.

Selekčné médium = MS základné médium + 30 sacharózy, 0,2 mg L IAA, 1 mg I BAP, 0,9 % agaru + 500 mg L cefotaxímu & 100 mg " kanamycínu.

Lol1 sekvencia kódujúca AFP a PR1a apoplastickú cieľovú sekvenciu sa PCR amplifikovali s 5' a 3' oligonukleotidovými primermi vytvorenými za účelom generovania vhodných reštrikčných miest tak, aby sa mohli ligovať na BamHI mieste a zohriaty výrobok sa vložil do NcoI/EcoRI otvoreného pUC intermediálneho plazmidového vektora (Messing 1983). Lol1 AFP sa oddelene vložil do troch pUC vektorov za rozličné promotórové sekvencie (granulová väzba syntázy škrobu; kruhový vírus na ružičkovom keli; dvojité 35S vírus mozaiky ružičkového kelu).

Potom boli ďalej klonované na rastlinný transformačný binárny vektor a premiestnené do tabaku s použitím transformácie prostredníctvom *Agrobacterium*.

PCR reakčné zmesi obsahovali 5 µl x10 Taq reakčnej tlmivej zmesi, 1 µl dNTPs, 1 µl 5' a 3' primerov (50 pmol µl), 1 µl templátu Lol1, 0,5 µl Taq polymerázy a 0,05 µl pfu dokazovacieho čítacieho enzýmu. Na skúmavky sa naniesol minerálny olej a podrobili sa 30 cyklom po 1 minúte pri 94 °C, 1 minúta pri 55 °C a 1 minúta pri 72 °C po prvotnom kroku denaturácie pri 94 °C po dobu 2 minút.

Vylúhovanie PCR amplifikačných výrobkov sa uskutočnilo s vhodnými reštrikčnými enzýmami v odporúčanom tlmivom roztoku (Boehringer Mannheim) pri 37 °C po dobu 16 hodín. Lúhovacie zmesi sa separovali na 1 % agarózovom géli a príslušné pásy sa odstránili a vyčistili s použitím Qiagen rýchlej DNA gélovej čistiacej sady podľa návodu od výrobcu.

Priložený a plazmidový vektor sa spojili s použitím T4 ligázy a 5 x 10 tlmivého roztoku v súlade s odporúčaním Stratgene pri 16 °C po dobu 16 hodín. Kompetentné bunky *E. coli* sa transformovali s použitím 2 µl ligačnej reakcie, umiestnili na platňu a nechali rásť cez noc pri 37 °C. Transformanty sa identifikovali pomocou PCR s použitím špecifických 5' a 3' primerov. Plazmidová DNA sa potom izolovala ako je to opísané v Maniatis, Zväzok 1 a správne usporiadanie potvrdilo reštrikčné lúhovaciu analýzu.

Priložené HindIII/EcoRI sa odstránili a ligovali ako predtým do HindIII/EcoRI vylúhovaného všeobecného rastlinného transformačného vektora (GPTV). Kompetentné *E. coli* sa transformovali a transformanty sa identifikovali pomocou PCR; následne sa sekvenovaním potvrdilo, že izolovaná plazmidová DNA bola správna.

Tri rozličné GPTV vektory sa oddelene transformovali na *Agrobacterium tumefaciens* (kmeň LBA 4404) s použitím metódy zmrazovania a rozmrazovania (freeze thaw method) opísanej v príručke Plant Molecular Biology PMAN A3/7.

Semená *Nicotiana tabacum* (var *Petit Havana*) boli povrchovo sterilizované po dobu 10 minút s roztokom 10 % chlornanu sodného a po trojitom prepláchnutí s destilovanou vodou sa preniesli na Murashige & Skoog základné médium + 3 %

sacharózy + 0,9 % agaru. Semená sa pestovali dva týždne, následne sa preriedili na 2 na jednu nádobu a potom sa získali sterilné rastlinky pravidelným mesačným prestrihávaním do MS základného média + 3 % sacharózy + 0,9 % agar.

Bunky *Agrobacterium* obsahujúce vhodný plazmid sa kultivovali cez noc v náleve Lennox (5g/l NaCl, 10 g/l extraktu z kvasníc, 10 g/l bactotryptónu a 15g/l agaru), potom sa 10 minút centrifugovali pri 3000 x g a resuspendovali v MS základnom médiu + 3 % sacharózy. Disky listov tabaku odrezávané sterilným korkovým vrtákom sa nainfikovali inkubovaním s kultúrou *Agrobacterium* po dobu 10 minút, potom sa vysušili na sterilnom filtračnom papieri a umiestnili rubom hore na plát s mladou kultúrou tabakových buniek.

Infikované listy boli inkubované pri 26 °C po dobu 2 dní pri svetelnej intenzite 2000 luxov a potom odstránili z plátov s mladou kultúrou a premiestnili na selekčné médium. Potom sa inkubovali pri 3000 luxoch, 26 °C, pri 16 hodinách svetla a 8 hodinách tmy a každé dva týždne sa premiestnili na čerstvé médium. Novo rastúce výhonky objavujúce sa na okrajoch disku sa premiestňovali na zakoreňovanie do MS základného média + 3 % sacharózy, 500 mg/l cefotaxímu & 100 mg/l kanamycínu.

Po zakorenení a vyrastení 3 až 4 listov sa jeden list z niekoľkých línií každej rastlinky plus z niekoľkých netransformovaných kontrolných rastliniek odstránilo za účelom testovania na RI. Pletivo listu sa umiestnilo do Eppendorfovej skúmavky a vylúčená miazga sa centrifugovala. Obsah sacharózy v miazge sa pred testovaním upravil na 30 % hmotn.

Niekoľko rastlinných línií z každej konštrukcie vykazovalo výraznú aktivitu inhibície rekryštalizácie. Extrakty z každej z kontrolných rastliniek nevykazovali žiadnu aktivitu. Tým sa jasne dokázalo, že Lol1 AFP bol transformovaný do tabaku, t.j. do rastliny, ktorá nemá vlastný AFP a úspešne sa prejavila ako aktívny proteín bez potreby aklimatizácie na chlad.

Rastliny na účely pestovania sa umiestnili do črepníkov s 50 % perlitu a 50 % rašelinovej zmesi a opätovne presadili na kvitnutie do miestnosti so striedaním 16 hodín svetla pri 26°C a 8 hodín tmy pri 22 °C. Kvety boli samoopelňované a semená sa uskladňovali pri +4°C.

Príklad 9

Aby sa dokázalo, že AFP podľa vynálezu nepotrebuje glykozyláciu na to, aby bol aktívny, exprimovala sa kódovacia oblasť v prokaryotickom systéme. Vytvoril sa kmeň *Escherichia coli* s obsahom AFP cDNA.

Lolium cDNA sa klonovalo na pET32 plazmid z Novagenu s obsahom tioredoxínu na vyjadrenie cieľového génu ako fúzovaného proteínu. Všetky enzýmy boli z Boehringer Mannheim a boli použité po návodu od výrobcu. Konštrukcia vyjadrovacích plazmidov, transformácia a rast *E. coli* sú opísané v príručkách Novagen pET systém a Promega Applications.

Lolium cDNA sa klonovalo na pET-32 plazmid ako PCR amplifikačný fragment, s kompatibilnými reštrikčnými koncami na ligáciu do viacnásobného klonovacieho miesta pET-32 plazmidu. Tento bol pripravený s použitím *Lolium* cDNA ako templátu a 5' oligonukleotidového primeru (TTTGCGCTCGAGTTAAGCGTCTGTCACGACTTTG a 3' oligonukleotidového primeru (TTTGCGCCATGGATGAACAGCCGAATACGATTTC), ktorými sa začína NcoI reštrikčné miesto na 5' konci a XhoI reštrikčné miesto na 3' konci amplifikačného fragmentu. Reakcie sa uskutočnili v termálnom cyklovači s použitím Taq DNA polymerázy na 25 cyklov (denaturácia pri 94 °C, zohrievania od 35 °C do 60 °C, expresia pri 72 °C). Všetky nasledujúce PCR reakcie sa uskutočnili za rovnakých podmienok. NcoI/XhoI PCR amplifikačný fragment sa potom klonoval na NcoI/XhoI vylúhovaný pET-32 plazmid a transformoval do kompetentných buniek *E. coli* (kmeň XL1-modrý). Po transformácii sa umiestnili na LB-ampicilínové platne a nechali rásť 16 hodín pri 37 °C. 10 transformantov rezistentných na ampicilín sa zozbieralo a analyzovalo na integráciu *Lolium* cDNA pomocou PCR s použitím pET protiprúdových a poprúdových primerov z Novagenu.

Plazmid DNA sa izoloval z 3 pozitívnych transformantov pomocou minprep a vylúhoval pomocou XhoI a NcoI na transformáciu do kompetentných buniek *E. coli* BL21 (DE3) ako je to opísané v príručke pET systém. Transformované bunky sa umiestnili na LB-ampicilínové médium a inkubovali 24 hodín pri 37 °C spolu s kontrolnou vzorkou vyrobenou bez transformovaných BL21(DE3) *E. coli*.

Tri pozitívne kolónie transformantov sa vyselektovali, kultivovali v LB-ampicilínovom médiu a inkubovali 1 hodinu pri 37 °C do dosiahnutia O.D. ($\lambda=600$ nm) 0,6 a potom inokulovali do média s väčším objemom a pretriasli pri 37 °C. Keď O.D. dosiahlo 0,5, bunky sa indukovali IPGT na proteínovú expresiu po dobu 3 hodín, ako je to opísané v príručke pET systém.

Vyjadrené proteíny sa izolovali z cytoplazmy buniek *E. coli*, ako je to opísané v príručke pET systém; bunky sa zozbierali centrifugáciou, resuspendovali v HEPES tlmivom roztoku (25 mM HEPES, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5) a zničili pôsobením ultrazvukových vibrácií po dobu 10 sekúnd. Cytoplazmatické proteínové frakcie sa centrifugovali a kal sa zozbieral. Alikvotná časť kalu sa upravila tak, aby podiel sacharózy bol 30 % hmotn. a testovala sa na aktivitu inhibície rekryštalizácie ľadu, ako je to opísané v Príklade 3. Cytoplazmatický proteínový extrakt vykazoval významnú RI aktivitu, zatiaľ čo cytoplazmatický proteínový extrakt vyrobený rovnakým spôsobom z kontrolnej vzorky buniek *E. coli* bez integrovania *Lolium* cDNA nevykazoval žiadnu aktivitu.

Fúzaný proteín sa vyčistil pomocou stĺpca na afinitu ku kovom a tioredoxín sa odstránil vylúhovaním s trombínom. Identita rozštiepeného AFP sa potvrdila proteínovým sekvenovaním N-konca a tento rozštiepený proteín tiež vykazoval významnú aktivitu inhibície rekryštalizácie ľadu.

Z vyššie uvedeného vyplýva, že ne-glykozylovaný mrazuvzdorný proteín *Lolium* perenne vyjadrený v *E. coli* si zachoval aktivitu inhibície rekryštalizácie ako fúzaný výrobok s tioredoxínom aj po štiepení trombínom.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Mrazuvzdorný proteín, ktorý môže byť odvodený od rastlín, u ktorých 40 % ich aminokyselín je zo skupiny serín, treonín a asparagín a ktorých aminokyselinová sekvencia sa minimálne z 80 % prekrýva s nasledovnou sekvenciou:

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

ako aj modifikované verzie tohoto proteínu, u ktorých táto modifikácia materiálne neovplyvňuje vlastnosti inhibície rekryštalizácie ľadu.

2. Mrazuvzdorný proteín podľa nároku 1, ktorý môže byť odvodený od trávy.

3. Mrazuvzdorný proteín podľa nároku 1, kde prekrytie je aspoň 95 %.

4. Mrazuvzdorný proteín podľa nároku 1, kde prekrytie je 100 %.

5. Mrazuvzdorný proteín podľa nároku 1, ktorý bol modifikovaný glykozyláciou.

6. Nukleokyselinová sekvencia, ktorá je schopná kódovať mrazuvzdorný proteín podľa nároku 1.

7. Nukleokyselinová sekvencia podľa nároku 6, ktorou je:

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

AAT AAC GTA TCC GGG AAC GAT AAT AAT GTA TCC GGG AGC TTT
CAT ACC GTA TCC GGG GGG CAC AAT ACT GTG TCC GGG AGC AAC
AAT ACC GTA TCT GGG AGC AAC CAC GTT GTA TCT GGA AGC AAC
AAA GTC GTG ACA GAC GCT TAA

aj s príslušnými alelami.

8. Mrazený potravinový výrobok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje mrazuvzdorný proteín podľa nároku 1.

9. Mrazený potravinový výrobok podľa nároku 8, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že je to zmrazená cukrovinka.

10. Spôsob získavania AFP podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že AFP sa pripravuje pomocou geneticky modifikovaného organizmu.

11. Spôsob podľa nároku 10, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že organizmom je mikroorganizmus alebo rastlina.