



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

215 260 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 4087/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 03. 25.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/498,561 1990. 03. 23. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/NL 91/00048
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 91/14772

(51) Int. Cl.⁶

C 12 P 1/00

C 12 N 11/16

A 23 K 1/165

C 12 N 15/52

(40) A közzététel napja: 1992. 10. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1998. 11. 30.

(72) Feltalálók:

Hoekema, Andreas, Oegstgeest (NL)
Pen, Jan, Leiden (NL)
Quax, Wilhelmus Johannes, Voorschoten (NL)
Rietveld, Krijn, Vlaardingen (NL)
Sijmons, Peter Christiaan, Amsterdam (NL)
Verwoerd, Teunis Cornelis, Leiden (NL)
van Ooyen, Albert J. J., Amsterdam (NL)

(73) Szabadalmasok:

Gist-Brocades N. V., Delft (NL)
Mogen International N. V., Leiden (NL)

(74) Képviselő:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Eljárás in vitro reakció katalizálásra transzgenikus magokban lévő enzimmel és eljárás ilyen transzgenikus magokat termelő növények előállítására

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás egy *in vitro* reakció katalizálására, amely abban áll, hogy

- (i) transzgenikus – magvaiban egy enzim megnövelt mennyiségét tartalmazó – növényekből magvakat nyernek,
(ii) az említett magvakat hozzáadják egy szubsztrátot tartalmazó reakcióelegyhez és

- (iii) az enzimet reagáltatják a reakcióelegyben lévő szubsztráttal.

A találmány tárgyát képezik továbbá ilyen magokat termelő transzgenikus növények, ehhez expressziós konstrukciók előállítására szolgáló eljárások, és a magok alkalmazása állatok tápértékfelvételének fokozására szolgáló eljárásban.

A találmány tárgya eljárás fontos enzimek előállítására transzgenikus növények magvaiban, valamint az így előállított magvak felhasználására az ipari folyamatok során, anélkül, hogy az enzimet extrahálni és/vagy izolálni kellene.

Számos ipari folyamatban alkalmaznak enzimeket. Ezek közé tartoznak a detergens, textil, tej, élelmiszer és üdítő, táp és egyéb iparok.

Az enzimeket jelenleg ipari méretekben vagy fermentációs eljárásokkal állítják elő, vagy növényi, illetve állati forrásokból izolálják. A mikrobiálisan termelt enzimek közé tartoznak a proteázok, amilázok, cellulázok, pektinázok, fitázok és mások. Ez enzimek előállítása fermentációs eljárással nagyon hatékony, és több mint 10 gramm per liter táptalajtermelő-képességet lehet elérni.

Annak a lehetőségét vizsgáljuk, hogy értékes fehérjék előállítására transzgenikus növények használhatók-e. A pillanatnyilag ismert példák az interferon előállítása dohányban (Goodman et al., 1987), enkefalinok előállítása dohányban (*Brassica napus* és *Arabidopsis thaliana*) (Vandekerckhove et al., 1989), antitestek előállítása dohányban (Hiatt et al., 1990), valamint humán szérum-albumin előállítása burgonyában (Sijmons et al., 1990).

A gyakorlatban egyre növekvő számú növényfaj transzformációja, főleg a kétszikű fajoké (például a dohány, burgonya, paradicsom, *Petúnia*, *Brassica*) rutin eljárássá vált a szakterületen jártas szakemberek számára (Klee et al., 1987; Gasser and Fraley, 1989). Az idegen gének növényekben való expressziójának stratégiája jól megalapozottá vált (Gasser and Fraley, 1989). Növényi gének szabályozó szekvenciáit azonosították, amelyeket felhasználtak olyan kiméra gének készítésére, amelyeket expresszálni lehet növényekben és növényi sejtekben.

A génkonstrukciók növényekbe való bevezetéséhez számos technológia ismert, például az *Agrobacterium tumefaciens* vagy *Agrobacterium rhizogenes*-szel való transzformáció. Ezt a stratégiát alkalmazva számos növényi szövetet használtak fel, a választás nagymértékben függött a növényfajtól és szövettenyésztetben való elérhetőségétől. A sikeres példák közé tartoznak a protoplasztok, mikroszporák vagy pollenek, valamint az explantumok, úgy mint a levelek, száraz, gyökerek, hipokotilok és kotilok transzformációi. Emellett használják a DNS direkt bejuttatási módszerét protoplasztokba és növényi sejtekbe vagy szövetekbe, például a mikroinjektálást, elektroporációt, részecskebombázást és közvetlen DNS-felvételt (Gasser and Fraley, 1989).

Fehérjéket a növényi magvakban számos különböző expressziós rendszerrel elő lehet állítani. Például, egy konstitutív promotor, úgy mint a karfiol mozaikvírus (CaMV) (Guilley et al., 1982) 35S promotere azt eredményezi, hogy az expresszált fehérje felhalmozódik a magvakban, többek között a transzgenikus növényekben. Egy másik módszer szerint a magvak tartalék fehérjéit kódoló gének promotereit alkalmazhatjuk. A mag tartalék fehérjék erősen szövetspecifikus és állapotspecifikus módon

expresszálódnak (Higgins, 1984; Shotwell and Larkins, 1989), azaz a gének csak a magvakban expresszálódnak, és csak a mag fejlődése során.

Egy mag tartalék fehérjét (összefoglalva: Higgins, 1984; Shotwell and Larkins, 1989) úgy határozzunk meg, mint bármely olyan fehérje, amely jelentős mennyiségben (a mag összfehérjének egészen a 90%-ig) akkumulálódik a fejlődő magban, és amely a csírázás során hidrolizál, ezzel tápanyagforrást szolgáltat a palánták korai növekedéséhez. A fehérjék egy sejten belüli térrészben találhatóak, ezeket nevezik fehérjetesteknek, vagy tároló vakuólumoknak. Ez a fehérjetest proteáz inhibitorokat tartalmaz, és egy proteázmentes környezetet biztosít. A tartalék fehérjéket lebontó proteázok a csírázás után 3–6 nappal válnak aktívvá (Larkins, 1981).

Számos tartalék fehérje gént izoláltak és jellemezték, valamint az 5' és 3' határoló régiókat is jellemezték (összefoglalás: Casey and Domoney, 1987). A globulinokra és albuminokra példák lehetnek a szójabab glicinin és konglicinin génjei (Fischer and Goldberg, 1982; Harada et al., 1989), a borsó legumin és vicilin génjei (Lycett et al., 1984; Higgins et al., 1988), a 11S lóbab gén (Baumlein et al., 1986), a 7S phaseolin gén a *Phaseolus*-ból (Doyle et al., 1986), a cruciferin és napin gének a *Brassica*-ból (Ryan et al., 1989; Scofield and Crough, 1987; Radke et al., 1988), a heliantin gén a napraforgóból (Vonder Haar et al., 1988; Jordano et al., 1989), valamint a 2S albumin és cruciferin gének az *Arabidopsis thaliana*-ból (Vandekerckhove et al., 1989; Pang et al., 1988). Más példák találhatóak a prolaminokat és glutelineket kódoló génekben (Casey and Domoney, 1987). Általában, a tartalék fehérjéket multigén családnak kódolják.

A magvak tartalék fehérjei génjeit dohány, petúnia és repce növényekbe vitték át (Okamura et al., 1986; Beachy et al. 1984; Sengupta-Gopalan et al., 1985; Higgins et al., 1988; Ellis et al., 1988; Barker et al., 1988; Vandekerckhove et al., 1989; Altenbach et al., 1989). A borsó bétaphaseolin 5' szabályozó régióját használjuk a béta-glükuronidáz (Bustos et al., 1989), a fitohemagglutinin (Voelker et al., 1989), a luciferáz (Riggs et al., 1989), és a zein (Hoffman et al., 1987) expressziójának a szabályozására (Bustos et al., 1989) dohányban. Az *Arabidopsis thaliana* 2S albumin génjének a promotert használták egy ugyanabból a fajból származó módosított 2S albumin expressziójának szabályozására dohányban, *Brassica napus*-ban és *Arabidopsis thaliana*-ban (Vandekerckhove et al., 1989). A fentiekben említett géneket szövetspecifikus és fejlődésileg szabályozható módon expresszálták, azaz magban a mag fejlődése során. Mindegyik közleményben változott az expressziós szint, de a mag összfehérje 1,7%-át kitevő szintet is elérte (Voelker et al., 1989). Úgy találták, hogy a cDNS a heterológ expresszióban helyettesítheti a genomiális DNS intronjait, a funkcióképes és stabil mRNS alapjaként (Chee et al., 1986). Ezek az eredmények azt igazolják, hogy egy, a növényi molekuláris biológia területén jártas szakember képes stratégiákat tervezni egy adott gén mag-specifikus

expresszáására egy kiválasztott növényfajban, amely megközelíthető a transzformációs technológiával.

A kétszikűek magvainak a fejlődése során az összes fehérje-szintézis nagy része a tároló parenchyma sejtek fehérje-testeinek a vakuólumaiba irányul. Ennek a folyamatnak a szabályozására a fehérjék általában prekursorok formájában szintetizálódnak. A prekursor fehérjék hidrofób szignál-peptideket tartalmaznak, általában az N-terminálison, amelyek egy adott lépésben lehasadnak. Nagyszámú tartalék fehérje szignál-peptidet írtak el (Doyle et al., 1986; Pang et al., 1988; Vonder Haar et al., 1988; Iturriaga et al., 1989; Dorel et al., 1989; Voelker et al., 1989; Hattori et al., 1985; Lycett et al., 1983; Smith and Raikhel, 1989).

A szignál-peptidek általános alkalmazhatósága heterológ expressziós rendszerekben (például Sijmons et al., 1990; Vitale and Bollini, 1986; Slightom et al., 1986; Della-Cippa et al., 1987) alátámasztani látszik azt az elméletet, hogy ha egy szignál-peptidet fuzionáltatnak egy heterológ „utas-fehérjével”, ez felhasználható az utas-fehérje transzportálására és módosítására. A referenciák azt sugallják, hogy különböző „utas-fehérjék” lehetnek jelöltek egy ilyen expressziós rendszerben.

Azonban a növényeknek mint bioreaktoroknak az alkalmazásának a vonzó mivolta és életképessége ellenére a rendszer a mai napig nehézségekkel küzd. A fentiekben említett példáknál a növényt alkalmazzák bioreaktorként, és a kiválasztott fehérjét azután a transzgenikus növényi anyagból izolálják, azaz abból a szövetből, amely a kiválasztott fehérjét a legmagasabb koncentrációban tartalmazza. A kiválasztott fehérjének azokból a magvakból való izolálása, amelyekben öröklött módon is termelődik, komplikációkat okoz, valamint költségnövekedést (Krebbes and Venderkerckhove, 1990).

Ennek a problémának egy lehetséges megoldása az lehet, hogy elkerüljük annak szükségességét, hogy az expresszált fehérjét a növény anyagából kelljen extrahálni. A DD 275, 704 számú keletnémet szabadalmi leírásban a hőstabil β -glükánáz transzformált árpa nem csírázó magvaiban való expresszáására alkalmas konstrukciót írnak el, valamint a magvak alkalmazását a sörgyártásban. Azonban a kismagvú gabonanövények manipulálásánál egy állandó probléma a gabonanövények protoplasztjainak transzformálása mellett a transzformált növények regenerálása is, amelyet nem írnak le a szabadalmi leírásban. Így tehát nem lehetséges enzimatartalmú magvak előállítása a publikációban leírt eljárással.

A jelen találmány tárgya legalább egy kiválasztott enzimet megnövelt mennyiségben tartalmazó magvakat termelő transzgenikus növények előállítása, amely magvakat különböző ipari eljárásokban lehet használni, vagy élelmiszerekben, illetve tápokban az emésztési reakciók katalizátoraiként anélkül, hogy előtte az említett enzimeket extrahálnánk és/vagy izolálnánk.

A találmány DNS konstrukciók előállítására is vonatkozik, növények transzformálására, amelyek képesek számos, számunkra érdekes enzimet expresszálni a magvakban. A konstrukciók olyan szignál-szekvenciákat tartalmaznak, amelyeket funkcionálisan az expresszálandó

enzimet kódoló DNS szekvenciához kapcsolunk. Ezek a konstrukciók olyan szabályozó szekvenciák irányítása alatt állnak, amelyek képesek a kiválasztott enzimeknek a magvakban való expresszióját szabályozni.

5 A jelen találmány tárgya továbbá a transzgenikus növények magvainak alkalmazása enzimek stabil és jól kezelhető tartalékformájaként, in vitro reakció katalizálásra, melynek során a transzgenikus magokat egy szubsztátot tartalmazó reakcióelegyhez hozzáadjuk, és az enzimet a reakcióelegyben lévő szubsztáttal hagyjuk reagálni; vagy egy állat tápértékfelvételének javítására, melynek során az állattal megetetendő takarmányhoz vagy táphoz keverjük a transzgenikus magokat. Az enzimek kiszáritott környezetben vannak, amelynek alacsony a proteázaktivitása, ezért védettek a lebomlás ellen.

10 Emellett a magvak felhasználása enzimek tárolására egy stabil hordozót szolgáltat, amely könnyen csomagolható, szállítható, és az aktuális felhasználás során könnyen kezelhető.

20 Az enzimek stabilak maradnak a magvakon belül, és így felhasználhatók a tiszta enzim helyettesítésére. Ez az előny, összekapcsolva a magtermelő növények növesztésének alacsony költségével, ezeknek az enzimeknek egy gazdaságos forrását jelenti. Tehát a jelen találmány lehetővé teszi a különböző enzimek termelésével, tárolásával és felhasználásával kapcsolatos költségek csökkentését.

Az ábrák ismertetése:

1. ábra A fitáz cDNS klónozása.
2. ábra A pMOG23 bináris vektor.
3. ábra A Brassica napus-ból származó cruciferin magbéli tartalékfehérje genomális szekvenciája.
4. ábra A különböző konstrukciókban alkalmazott szintetikus oligonukleotid duplexek.
5. ábra A pMOG429 plazmid. A pMOG23 bináris vektor, amely az érett fitáz enzimet kódoló cDNS részt tartalmazza, a cruciferin szignál peptidet kódoló DNS szekvencia után.
6. ábra A fitázt tartalmazó őrölt magvak hozzáadásának hatása a szerves foszfor fitázból való felszabadulására.
7. ábra A Bacillus licheniformis α -amiláz génjének genomális szekvenciája, amit a pROM54 vektoron található.
8. ábra A pMOG29 plazmid. A pUC18 plazmid, amely egy expressziós kazettát tartalmaz növényekben való konstitutív expresszió céljából, valamint egy dohány szignál-peptidet.
9. ábra A pMOG227 plazmid. Bináris vektor, az érett α -amiláz enzimet kódoló gén egy részét tartalmazza egy szignál-peptidet kódoló dohány-szekvencia után beépítve, egy konstitutív expressziót biztosító expressziós kazetta után beépítve.
10. ábra Az Aspergillus fitáz dózishatás összefüggése egy in vitro emésztési modellben.
11. ábra Az Aspergillus fitáz és dohánymagban található fitáz dózishatás összefüggése egy in vitro emésztési modellben.

12. ábra Olyan oligoszacharid mintázatok összehasonlítása, amelyeket burgonyakeményítő emésztésével kapunk,

- A) *Bacillus licheniformis* α -amilázt kódoló génnek transzformált dohánymagvak felhasználásával,
- B) *Bacillus licheniformis* α -amiláz felhasználásával, és
- C) *Bacillus amyloliquefaciens* α -amiláz felhasználásával.

13. ábra Olyan oligoszacharid mintázatok összehasonlítása, amelyeket kukoricakeményítő emésztésével kapunk,

- A) *Bacillus licheniformis* α -amilázt kódoló génnel transzformált dohánymagvak felhasználásával,
- B) *Bacillus licheniformis* α -amiláz felhasználásával, és
- C) *Bacillus amyloliquefaciens* α -amiláz felhasználásával.

A találmány szerint előállítható érdekes enzimek közé bármely olyan enzim beletartozik, amelyet egy ipari folyamatban fel lehet használni.

Az érdekes, kiválasztott enzimek közé bármely enzim beletartozhat, amely heterológ azon növény számára (azaz nem természetes a növényfaj számára), amelyben előállítjuk. Szintén ide tartoznak azok az enzimek, amelyek homológok azon növények számára (azaz természetesek a növény számára), amelyekben előállítjuk, ha rekombináns DNS technikával nagy mennyiségben expresszáljuk.

Ezeket az enzimeket a hidrolázok közül választjuk, lehetnek proteázok, cellulázok, hemi-cellulázok, foszfatázok, lipázok, pektinázok, amilázok, lizozimek, pullulanázok és kitinázok; lehetnek liázok, például pektinliáz; és lehetnek izomerázok, például glükóz-izomeráz.

Az előnyben részesített enzimek közé tartozik a fitáz, az α -amiláz, cellobiohidroláz, endo-glükánáz, endo-xilanáz, endo galaktanáz, α -galaktozidáz, arabinanáz, szerinproteázok, kimozin, papain, gasztrikus lipázok, pektin-liáz és glükóz-izomeráz.

Az ipari folyamatok során az extrahált és/vagy izolált enzimeket egy olyan reakcióelegybe teszik bele, akár in vivo, akár in vitro, amely legalább egy szubsztlátot tartalmaz, és amelyben az enzimek képesek a szubsztlát(ok) olyan reakcióit katalizálni, hogy a kívánt hatást vagy terméket kapjuk.

Az ilyen ipari folyamatok közé tartoznak, de nem csak ezekre korlátozódnak, az in vitro eljárások, mint például a fitázok alkalmazása a szójafeldolgozásban vagy egy ipari eljárásban, mint például a nedves őrlésben inozit vagy inozit-foszfatok fitátból való előállítására. Hemicellulázok, és cellulázok is használható, általában sejtfal lebontó enzimekként. Hasonló módon, az α -amilázok is használható a sütőiparban, a sült termékek konzisztenciájának javítására; az α -amiláz, amiloglükozidáz, xilanázok, és/vagy a glükóz-izomeráz használható a keményítő elfolyósítására; a ligninázok és/vagy a xilanázok használható a papír iparban; a glükánázok, pektinázok és/vagy cellulázok használha-

tók az élelmiszer és üdítőiparban, például a fermentációs vagy erjesztési iparokban.

Az enzimeknek az előzőekben említett in vitro eljárásokbeli hatása mellett a magvakban tárolt enzimek is használható in vivo emésztési reakciókban. Ily módon az enzimek megkönnyítik a tápanyagok felszabadulását az élelmiszerekből, amelyek egyébként az azokat megemésztő állatok számára nem lennének könnyen hozzáférhetőek.

Az ilyen in vivo eljárásokban használandó enzimek közé tartoznak (anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat) a fitázok, cellulázok, hemi-cellulázok, pektinázok és amilázok. Az enzimek az élelmiszerek javított emésztéséhez vezetnek. Az enzimek mint emésztési segédanyagok alkalmazható emberekben, például olyan betegségekben, mint a cisztás fibrózisban, vagy a pankreatikus elégtelenségek egyéb eseteiben. A magvakban levő lipázok, proteázok és cellulázok felhasználható gyógyászati segédanyagként, hogy enyhítsék az ilyen betegségekhez kapcsolódó emésztési problémákat.

A jelen találmány szerint a kívánt enzimet transzgenikus növények magvaiban állítjuk elő. Az így kapott magvakat használjuk azután olyan ipari folyamatokban, amelyeknek szükségük van a bennük levő magvakra, anélkül, hogy előtte először extrahálnánk és/vagy izolálnánk az enzimet.

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy az ipari felhasználású enzimeket tartalmazó magvakat közvetlenül felhasználhatjuk az ilyen eljárásokban vagy az ilyen felhasználás céljára először feldolgozzuk, például a kívánt konzisztenciára való őrléssel. Bármelyik eset fordul is elő, a teljes vagy őrlött magvakat amint vannak, úgy bevihetjük a kívánt eljárásba, anélkül, hogy tovább extrahálnánk és/vagy izolálnánk az enzimet, és anélkül is, hogy az enzim aktivitása csökkenne.

A transzgenikus növények közé, amint az a jelen találmány szövegkörnyezetében meghatározható, beletartoznak a növények és utódaik, amelyeket genetikailag módosítottak, hogy magvaikban legalább egy, számunkra érdekes enzim termelését megnöveljük. A számunkra érdekes enzimek termelését ezáltal a vad típusú növényvariánsban megtalálható szint fölé lehet növelni.

A jelen találmány szövegkörnyezetében az „egy enzimet megnövekedett mennyiségben tartalmazó magvak” szakkifejezés specifikusan egy statisztikailag jelentős számú magra vonatkozik, amely magok egy enzimből statisztikailag megnövekedett átlagmennyiséget tartalmaznak, azonos számú nem módosított magvakban levő enzim átlagmennyiségével összehasonlítva.

Azok közé a növények közé, amelyek magvaikban a jelen találmány szerint a számunkra érdekes enzimeket termelik, beletartoznak (anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat) a *Nicotiana* (például *tabacum*), *Brassica* (például *napus* vagy *oleracea*), *Arabidopsis* *Glycine* (például *max*), *Zea* (például *mays*), *Amaranthus*, *Hordeum* (például *vulgarum*) és *Pisum* (például *sativum*), *Juglans* (például *regia*), *Arachis* (például *hypogaeae*), *Medicago* (például *sativa*), *Phaseolus* (például

ul vulgaris), Pisum (például sativum), Triticum (például aestivum), Panicum L., Helianthus (például annus), Avena (például sativa) és Oryza (például sativa).

A választott faj előnyösen magas éves magtermeléssel kell hogy rendelkezzen évenként, valamint a maga kémiai és fizikai tulajdonságainak összeegyeztethetőnek kell lenniük azzal az ipari folyamattal, amely céljára az enzimet előállítottuk. Néhány esetben például, amikor ezeket a magvakat a szülő növény transzformálása után élelmiszerekbe kell betenni, akkor olyan növényfajt kell választani, amely olyan magvakat termel, amelyeknek alacsony a tannin és egyéb, a tápanyagokban nem előfordulható faktortartalma. Más esetekben a transzgenikus magvaknak az a tulajdonsága, hogy megadott konzisztenciára őrlhetők, a választás kritériuma lehet, ha a magvakat adalékanyagként használjuk, például lisztben. Egy megvalósítási mód szerint, a számunkra érdekes enzimeket tartalmazó magvakat közvetlenül lehet alkalmazni a kiválasztott eljárásban (például tápokban) úgy, ahogy vannak, átalakítás nélkül, amelyet szükség esetén megelőz egy héjtalanítás és/vagy szárítás a begyűjtés után.

A legmegfelelőbb növényfaj megválasztása modellezési kísérleteken alapulhat. A számunkra érdekes enzimet a vad típusú magvakkal együtt adhatjuk ahhoz az ipari eljáráshoz, amely céljaira végül a transzgenikus magvakat előállítjuk.

A fentiekben említett magtermelő növények genetikai módosítása arra irányul, hogy egy- a számunkra fontos enzimet kódoló gént tartalmazó expressziós konstrukciót juttassunk be a kiválasztott növénybe. Ez az expressziós konstrukció tartalmazhat egy, a növény számára heterológ gént, amely az olyan promotor és terminátor régiók szabályozása alatt áll, amelyek képesek a számunkra fontos enzimet kódoló gén expresszióját irányítani a növény magvaiban. Emellett egy olyan gént is kell tartalmaznia, amely a növény számára homológ, és egy olyan szabályozó régió irányítása alatt áll, amely képes a számunkra érdekes enzim túltermelését szabályozni. A túltermeléssel a számunkra érdekes enzim termelését a vad típusú növényvariánsban meglevőnél magasabb szinten szándékozunk megvalósítani.

Számos technika ismert a számunkra fontos enzimet kódoló expressziós konstrukciót tartalmazó DNS szekvenciának a kiválasztott növénybe való bejuttatására. Ezek közé a technikák közé tartozik (anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat) a protoplasztok transzformálása a kalcium/polietilén-glikol módszerrel, az elektroporáció és mikroinjektálás, vagy a (borított) részecskékkal való bombázás (Potrykus, 1990).

Ezek mellett az úgynevezett közvetlen DNS-transzformációs módszerek mellett számos, vektorokon alapuló transzformációs rendszer is széles körben elterjedt, például a virális vektorokon [azaz a karfiol mozaik víruson (CaMV)] és bakteriális vektorokon (azaz az Agrobacterium fajba tartozó plazmidokon) alapuló transzformáció (Potrykus, 1990). A szelektálás és/vagy átvizsgálás után a transzformált protoplasztokat, sejteket és növényi részeket teljes növényekkel regenerál-

hatjuk, a szakterületen ismert módszerek alkalmazásával (Horsch, R. B. et al., 1985). A transzformációs és vagy regenerációs technikák megválasztása a jelen találmány szempontjából nem kritikus.

5 A kétszikűeknél a jelen találmány egy előnyös kiviteli alakja tartalmazza egy bináris vektorrendszer alkalmazását (Hoekema et al., 1983, Schilperoort et al., 1984), amelyben olyan Agrobacterium törzseket alkalmazunk, amelyek a virulencia géneket tartalmazó *vir* plazmidot hordozzák, valamint egy kompatibilis plazmidot, amely az átviendő génkonstrukciót tartalmazza. Ez a vektor mind Escherichia coli-ban, mind 10 Agrobacteriumban képes szaporodni, és a Bin19 bináris vektorból származik (Bevan, 1984), amelyet a szabaddom szempontjából lényegtelen módon változtattunk meg. Az ebben a példában alkalmazott bináris vektorok a T-DNS baloldali és jobboldali határoló szekvenciái között egy, kanamicin rezisztenciát kódoló azonos NPTII-gént tartalmaznak (Bevan, 1984), valamint egy 15 többszörös klónozó helyet, ahova a kívánt génkonstrukciókat klónozni lehet.

Az egyszikű növények transzformálása és regenerálása nem egy standard eljárás. Az újabb tudományos 25 eredmények azonban azt mutatják, hogy elvileg az egyszikűek transzformálhatók, és a transzformált sejtekből transzgenikus növények regenerálhatók. Az ezen növényekre kidolgozott reprodukálható szövetenyesztő rendszerek fejlődése, a genetikai anyagnak a növényekbe való bejuttatására kidolgozott hatékony módszerek megkönnyítették a transzformációt. Jelenleg az egyszikűek transzformálására választható módszerek közé 30 tartozik az explantumok vagy szuszpenziós sejtek mikropjektill bombázása, valamint a protoplasztok közvetlen DNS felvétele vagy elektroporációja. Például transzgenikus rizsnövényeket sikeresen állítottak elő a 35 bakteriális hph (higromicin rezisztenciát kódoló) gén szelekciós markerként való alkalmazásával. A gént elektroporációval jutatták be (Shimamoto et al., 1989). Transzgenikus kukoricanövényeket úgy állítottak elő, hogy a Streptomyces hygroscopicus *bar* génjét, amely 40 foszfinotricin-aciltranszferázt kódol (ez az enzim inaktiválja a foszfinotricin nevű herbicidet) kukorica szuszpenziós tenyészet embriogén sejtjeibe juttatták be mikrorészecske bombázással (Gordon-Kamm et al., 45 1990). A genetikai anyag bejuttatását más egyszikű növények, például búza és árpa aleuron protoplasztjaiba már közölték (Lee et al., 1989). A búzanövényeket embriogén szuszpenziós tenyészetből szelektálták, oly módon, hogy csak az idős kompakt és noduláris 50 embriogén kalluszszöveteket szelektálták az embriogén szuszpenziós tenyészet létrehozásához (Vasil et al., 1990). Az ezekre az egyszikű növényekre kidolgozott transzformációs rendszereknek a kombinálása lehetővé teszi a jelen találmány alkalmazását egyszikű növényekre. Ezek a módszerek alkalmasak kétszikűek 55 transzformálására és regenerálására is.

A rekombináns gének növényekben való expressziója olyan részleteket is magában foglal, mint a gén transzkripciója a növényi polimerázokkal, a mRNS 60 translációja stb., amelyek a rekombináns DNS szakte-

rületen jártas szakemberek számára ismertek. Az alábbiakban csak a jelen találmány kellő szintű megértéséhez szükséges részleteket tárgyaljuk.

Azokat a szabályozó szekvenciákat használhatjuk a jelen találmányban, amelyekről ismert, vagy úgy találták, hogy magvakban a rekombináns DNS megfelelően magas expresszióját okozzák (a specifikus alkalmazás céljára, amint azt az alábbiakban tárgyaljuk). Az ilyen szabályozó szekvenciák olyan promoterek, amelyek aktívak a magvakban folyó transzkripció szabályozásában. Ezek közé tartoznak, anélkül, hogy csak rájuk korlátoznánk magukat, a magspecifikus génekből származó promoterek, főleg a tartalék fehérjék génjei, például a *Brassica napus* (Ryan et al., 1989) *cruA* promotere, vagy a konstitutíven expresszáldó gének promoterei, például a CaMV (karfiol mozaikvírus) 35S promotere (Guilley et al., 1982). A többi szabályozó szekvencia a terminátor szekvencia és poliadenilezési szignál, beleértve minden, növényben így működő szekvenciát; a példák közé tartozik az *Agrobacterium tumefaciens* nopalín szintetáz génje 3' határoló génje, illetve a *Brassica napus curA* génjének 3' határoló régiója. A szabályozó szekvenciák tartalmazhatnak enhanszer szekvenciákat is, például olyanokat is, amelyeket a CaMV 35S promotereben találtak, és mRNS stabilizáló (AIMV) RN4 leader szekvenciája (Brederode et al., 1980), vagy bármely más, az említett módon működő szekvencia.

A számunkra érdekes fehérje olyan környezetben lehet, amely a fehérje optimális stabilitását biztosítja a mag érése során. A sejt-kompartiment megválasztását, például azt, hogy legyen az a citoszol, endoplazmatikus retikulum, vakuólum, fehérje-test vagy periplazmatikus tér, használhatjuk a jelen találmányban arra, hogy egy ilyen stabil környezetet hozzunk létre, a számunkra fontos fehérje biofizikai paramétereitől függően. Az ilyen paraméterek közé tartoznak, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a pH optimum, a proteázokra való érzékenység, vagy az előnyös kompartiment molaritására való érzékenység. Jóllehet előnyösek a homológ szignál-szekvenciák, heterológ szignálszekvenciák is használhatók. Különösen előnyösek a mag tartalék fehérjéinek szignálszekvenciái.

A mag tartalék fehérjéit négy fő osztályba csoportosíthatjuk, az oldhatósági jellemzők alapján:

1. *Albuminok* – oldhatók vízben, és két fő osztályba csoportosíthatók (12S és 2S). A 12S csoportba tartoznak a borsóból és különböző babokból származhatnak például, a 2S albuminok származhatnak a *Brassica napus*-ból, *Arabidopsis thaliana*-ból, *Ricinus communis*-ből (ricinus-bab), *Bertholletia excelsa* (Brazil dió), borsó, gyökér és napraforgónövényekből.

2. *Globulinok* – sóoldatokban oldódnak, tartozhatnak a 7–8S csoportba, mint például a fazeolinok a *Phaseolus*-ból, a vicillinek borsóból, a konglicininek a szójababból, a zabvicillinek zabból, és a 7S globulinok más fajokból, vagy tartozhatnak a 11–14S osztályba, például a leguminok borsóból, a glicininek szójababból, a helianitinek napraforgóból, a kruciferinek repceből vagy tartozhat-

nak más fajokból, például *Arabidopsis*-ból vagy babból származó 11–14S fehérjék közé.

3. *Prolaminok* – oldódnak vizes alkoholokban, például a zeinek a kukoricából, a hordeinek az árpából, a búzából izolált gliadinok és a cirokból izolált kafirinek.

4. *Glutelinek* – savas vagy lúgos oldatokban oldódnak, és búzából izolálhatók.

Jóllehet vannak kivételek, a kétszikűek magvaiban levő fő tartalék fehérjék globulinok, az egyszikűekében levők prolaminok és glutelinek.

A jelen találmány szerinti megfelelő DNS konstrukciók minden elemét (promoterek, szabályozó, stabilizáló, szignál vagy terminációs szekvenciák) módosíthatjuk, ha szükséges, hogy befolyásoljuk a szabályozás jellegét, a szakterületen jártas szakember számára ismert módszerrel. A magban szükséges rekombináns fehérje mennyiségének (az „expressziós szint”) elég magasnak kell lennie ahhoz, hogy a transzgenikus magokat minor adalékanyagokként alkalmazzuk (térfogat, súly vagy költség alapon) a jelen találmány összes előnyös kiviteli alakjában.

Számos módszer alkalmazható transzgenikus növények előállítására, amelyeknek a magvai egynél több, számunkra érdekes enzimet tartalmaznak. Ezek közé tartoznak, anélkül, hogy korlátoznánk magunkat:

a) Egy vagy több, számunkra érdekes enzimet expresszáló transzgenikus növény keresztezése.

b) Egy növény transzformálása egy olyan DNS fragmenttel vagy plazmiddal, amely a számunkra érdekes enzimeket kódoló többszörös gént tartalmazza, a szükséges szabályozó szekvenciákat alkalmazva.

c) Növény szimultán transzformálása különböző DNS fragmentekkel vagy plazmidokkal, amelyek közül mindegyik tartalmaz egy számunkra érdekes enzimet kódoló gént, a szükséges szabályozó szekvenciákkal együtt.

d) Növények egymás utáni transzformálása, mindegyik alkalommal olyan DNS fragment vagy plazmid alkalmazásával, amelyek különböző, számunkra fontos enzimet kódoló gént tartalmaznak a szükséges szabályozó szekvenciákkal együtt.

e) Az előzőekben említett módszerek kombinálása.

Az eljárás, amelyet arra a célra alkalmazunk, hogy olyan magvakat kapjunk, amelyek egynél több, számunkra fontos enzimet tartalmaznak, nem kritikus a jelen találmány tárgya szempontjából.

Enzimek megnövekedett mennyiségét tartalmazó magvakat előállíthatunk más, a szakterületen jártas szakemberek számára ismert, az előzőekben említett rekombináns eljárástól eltérő módszerrel, azzal a feltétellel, hogy az eljárás olyan magvakat eredményez, amelyek a vad típusú magvakkal összehasonlítva megnövekedett mennyiségű enzimet tartalmaznak. Ilyen magvak előállíthatók például szomaklonális variációs technikák alkalmazásával. Továbbá, az ilyen technikákat alkalmazhatjuk önmagukban vagy olyan nemzési technikákkal együtt, amelyek a citoplazmatikus hímszterilitási technikát (Cms), vagy a mag hímszterilitási technikát (Nms) alkalmazzák (Mariani et al., 1990). A technikákat, például a szomaklonális variációt és ke-

resztezést, a Cms és Nms felhasználásával végezve, kombinálhatjuk a fentiekben említett rekombináns módszerekkel, abból a célból, hogy tovább növeljük a magvakban jelenlevő enzimek relatív mennyiségét. A magvakban levő enzimek mennyiségének megnövelésére alkalmazható nem-rekombináns módszereknél az 1983. április 7-én beadott 4378655 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésre hivatkozunk, mint az ilyen technikák leírásának forrására. Rá kell mutatni, hogy számos publikáció létezik, amelyek a citoplazmatikus hímsterilitást kihasználó nemesítési technikát írják le, amelyet P. LeClerq fedezett fel 1986-ban, valamint a megfelelő domináns fertilitást helyreállító (Rf) géneket, amelyeket M. L. Kimmer et al. fedeztek fel 1970-ben. Újabban a mag hímsterilitás alkalmazását írták el (Mariani et al., 1990). A növények nemesítésére vonatkozó, sokkal általánosabb leírás található az alábbi kiadványokban: James R. Welsh „Fundamentals of Plant Genetics and Breeding”, 1981; valamint J.M. Poehlman „Breeding Field Crops”, 1959.

A jelen találmány egy előnyös megvalósítási formája szerint egy kétszálú, fitázt kódoló kétszálú cDNS-t állítunk elő *Aspergillus ficuum*-ból izolált mRNS alapján (van Gorcom et al., 1991). A DNS konstrukciót a *Brassica napus* kruciferin nevű 12S tartalék fehérjeje szabályozó szekvenciájának irányítása alá helyezzük. A konstrukciót ezután egy bináris vektorba, például a pMOG23-ba klónozzuk (*Escherichia coli* K.12 DH5 α törzsben letétbe helyezve a Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands, 1990. január 29-én, CBS 102.90 leltári szám alatt). Ezt a vektort bejuttatjuk *Agrobacterium tumefaciens*-be, amely egy gyengített Ti plazmidot tartalmaz. Az ezt a konstrukciót tartalmazó baktériumsejteket együtt tenyésztjük dohányból vagy *Brassica* növényekből származó szövetekkel, majd a transzformált növényeket antibiotikumokat tartalmazó táptalajon szelektáljuk, és arra indukáljuk, hogy az adott táptalajon differenciálódott növényekké regenerálódjanak. A keletkező növények olyan magvakat termelnek, amelyek tartalmazzák és expresszálják a DNS konstrukciót.

A jelen találmány egy másik megvalósítási módja szerint a fitázt kódoló DNS konstrukciót a karfiol mozaikvírus (CaMV) 35S promoteréből származó szabályozó szekvencia irányítása alá helyezzük. A konstrukciót ezután egy bináris vektorba szubklónozzuk. Ezt a vektort bejuttatjuk *Agrobacterium tumefaciens*-be, amely egy legyengített Ti plazmidot tartalmaz. Az ezt a konstrukciót tartalmazó baktériumsejteket együtt tenyésztjük dohányból vagy *Brassica* növényekből származó szövetekkel, majd a transzformált növényi sejteket antibiotikumokat tartalmazó táptalajon növesztjük, majd arra indukáljuk, hogy ezen a táptalajon differenciálódott növényekké regenerálódjanak. A kapott növények tartalmazzák és konstitutíven expresszálják a DNS konstrukciót.

A transzgenikus magvak fitáz enzim aktivitását számos különböző módszerrel meg lehet határozni, ez nem kritikus a jelen találmány szempontjából, például ELISA vizsgálattal, Western blottal vagy direkt enzim-

vizsgálattal, kolorimetriás technikák vagy natív gélvizsgálatok alkalmazásával.

Az így előállított fitázt tartalmazó magvakat fel lehet használni az ipari folyamatokban, például nem kérődző állatok esetében tápadalékként, a szója feldolgozásában, vagy az inozit illetve inozit-foszfát fitátból való előállításában. Ha szükséges vagy kívánatos, akkor a magvakat felhasználás előtt először meg lehet őrölni a kívánt konzisztencia eléréséig, az ipari folyamat természetétől függően, anélkül, hogy extrahálnánk és/vagy izolálnánk a fitázt. A szakterületen általános jártassággal rendelkező szakember meg tudja határozni, hogy ezekre a lépésekre szükség van-e.

A magvakban előállított fitázt alkalmazni lehet a kukorica vagy cirok áztatása során. A magvakat meg lehet őrölni, mielőtt az áztatott kukoricához adnánk. A magvakból felszabadított fitáz működhet a fitinen, amely számos kukoricakészítményben jelen van. A fitin lebomlása az áztatott kukoricában előnyös a kukoricalekvár kereskedelmi értéknövekedése szempontjából, mivel ezt állati tápként vagy mikrobiális fermentációk tápanyagaként lehet használni. Emellett, a fitin lebontása megelőzheti a kukoricalekvár töményítése, szállítása és tárolása során fellépő lerakódások felhalmozódását a szűrőkön, csövekben, reaktorokban stb. (Vaara et al., 1989). A fitáz működése felgyorsíthatja a nedves kukorica őrlésében szerepet játszó áztatási folyamatokat és elválasztási folyamatokat.

A jelen találmány egy másik megvalósítási módja szerint a *Bacillus licheniformis*-ből származó α -amilázt kódoló genomiális DNS fragmentet a CaMV 35S promoter és enhancer szekvencia szabályozása alá helyezzük. Az A1MV-ből származó RNA4 mRNS-t stabilizáló leader szekvenciát is beépítjük, valamint az *Agrobacterium tumefaciens* nopalin szintetáz génje terminátor és poliadenilezési szignálszekvenciáját. A teljes konstrukciót ezután egy bináris vektorba klónozzuk. Ezt a vektort egy legyengített Ti plazmidot tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens*-be juttatjuk be. Az ezen a konstrukciót tartalmazó baktérium-sejteket együtt tenyésztjük dohányból származó szövetekkel, majd a transzformált növényeket antibiotikumokat tartalmazó táptalajon szelektáljuk, és arra indukáljuk, hogy ezen a táptalajon differenciálódott növényeké regenerálódjanak. A keletkező növények olyan magvakat termelnek, amelyek tartalmazzák és expresszálják a DNS konstrukciót.

A transzgenikus magvak α -amiláz aktivitását a jelen találmány szempontjából nem kritikus módszerekkel lehet meghatározni, például közvetlen enzimvizsgálatokkal, kolorimetriás technikákat alkalmazva vagy natív gélvizsgálatokat.

A magvakat használhatjuk az α -amiláz forrásaként, amelyet közvetlenül használhatunk az ipari folyamatokban, például a keményítő szirupok előállításában. Előnyösen, a magvakat először megőröljük, majd a teljes (megőrölt) keveréket használhatjuk az eljárásban, amit a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember meghatározhat.

Az alábbi példákat úgy adjuk meg, hogy a szakterületen átlagos jártassággal rendelkező szakember teljes leírást kapjon arról, hogy kell a találmányt alkalmazni, és nem szándékozunk a találmány oltalmi körét korlátozni. Erőfeszítéseket tettünk, hogy a használt számok pontosak legyenek (például mennyiségek, hőmérséklet, pH stb. vonatkozásában), de kísérleti hibákat és eltéréseket figyelembe kell venni. Ha külön nem jelöljük, akkor a hőmérsékletet Celsius fokban adjuk meg, a nyomás pedig közel atmoszférikus.

1. példa

Poli-A⁺ RNS izolálása Aspergillus ficuumból

Az *Aspergillus ficuum* NRL 3135 [DSM 932 (1983)] törzset az alábbi összetételű táptalajon növesztjük: 22,72 g/l kukoricaliszt (amilázzal kezelve pH=7-en, 85 °C-on 15 percig), 9,36 g/l glükóz, 2,9 g/l kálium-nitrát, 0,142 g/l kálium-klorid, 0,142 g/l magnézium-szulfát-7 víz és 56,8 mg/ml vas (II)-szulfát-7 víz. Hat nap elteltével a micéliumokat begyűjtjük.

0,5 g száraz micéliumot cseppfolyós nitrogénben lefagyasztunk, majd megőrünk. Ezt követően az anyagot Ultra Turrax-szal homogenizáljuk (teljes sebesség, 1 perc) 0 °C-on 3 M lítium-klorid, 6 M karbamid összetételű oldatban, majd éjszakán át 4 °C-on tartjuk, Auffray és Rougeon leírása szerint (1980). Az összes celluláris RNS-t úgy nyerjük ki, hogy 16 000×g-vel centrifugáljuk a szuszpenziót, majd kétszer extraháljuk egymás után fenol:kloroform:izoamilalkohol (50:48:2) arányú elegyével. Az RNS-t etanollal kicsapjuk, majd 1 ml TRIS-HCl (pH=7,4), 0,5% SDS elegyben oldjuk. A poli A⁺ szelekcióhoz az össz-RNS-t tartalmazó mintát 5 percre 65 °C-ra melegítjük, 0,5 M nátrium-klorid koncentrációt állítunk be, majd ezt követően oligo (dT)-cellulóz oszlopra visszük fel. Miután néhányszor mostuk 10 mM TRIS (pH=7,0), 1 mM EDTA és 0,1 mM nátrium-klorid összetételű oldattal, a poli A⁺ RNS-t eluálás után (10 mM TRIS pH=7,0, 1 mM EDTA eluálószer) összegyűjtjük.

2. példa

A fitázt kódoló cDNS készítése és klónozása

A cDNS első láncának szintéziséhez 5 µg poli A⁺ RNS-t, amelyet az 1. példa szerint izoláltunk, 16,5 µl vízben oldunk, és az alábbi komponenseket adjuk hozzá: 2,5 µl RNasin-t (30 E/µl), 10 µl puffert (összetétele: 50 mM TRIS-HCl pH=7,6, 6 mM magnézium-klorid, 40 mM kálium-klorid), 1 µl 1 mólos kálium-klorid, 5 µl 0,1 mM DTT, 0,5 µl oligo (dT)₁₂₋₁₈ (2,5 mg/ml), 5 µl 8 mM dNTP keverék, 5 µl BSA (1 mg/ml) és 2,5 µl Moloney MLV reverz transzkriptáz (200 E/ml). Az elegyet 30 percig 37 °C-on inkubáljuk, majd a reakciót 10 µl 0,2 M EDTA és 50 µl víz hozzáadásával állítjuk le. Ezután extraháljuk, 110 µl kloroformot alkalmazva, majd miután 5 percig centrifugáltuk, 5 M ammónium-acetátot és 440 µl abszolút etanolt adunk hozzá (-20 °C-on). A kicsapást szárazjég/etanol oldatban végezzük, 30 percig. Miután lecentrifugáltuk (10 perc, 0 °C), a cDNS/mRNS csapadékot megszáritjuk, 20 µl vízben oldjuk.

A fitázt kódoló cDNS izolálását polimeráz láncreakcióval (PCR) végezzük, két fragmentben. A két fragmentet kombináljuk, a génen belül található BamHI restrikciós hasítási hely alkalmazásával, így állítjuk elő a teljes hosszúságú cDNS-t. A fitáz cDNS klónozásának stratégiáját az 1. ábrán mutatjuk be.

A fitáz gén szekvenálása (van Gorcom et al., 1990) egy BamHI restrikciós hasítási helyet mutat az iniciációs kodon után körülbelül 800 bázispárral. Az említett BamHI hasítási hely körüli BamHI nukleotid szekvencia, valamint a fitáz gén start kodonját megelőző nukleotid szekvenciát és a stop kodonját követő nukleotid szekvenciát használjuk a PCR-ben használt oligonukleotid szekvenciák tervezéséhez.

A polimeráz láncreakciót a Taq polimeráz szállítója (Cetus) előírásai szerint végezzük, 1,5 µl, az első lánc szintézisének reakciótermékét tartalmazó oldatot és 0,5-0,5 µg oligonukleotidot tartalmazó oldattal. Az amplifikálást egy DNS amplifikáló berendezésben végezzük (Perkin Elmer/Cetus). 25 ciklust végzünk (2 perc °C, 2 perc 55 °C, 3 perc 72 °C), majd a reakcióelegyet fenol és kloroform extrakcióval fehérjementesítjük. A DNS-t kicsapjuk, feloldjuk egy pufferben (összetétele: 10 mM TRIS pH=7,0, 0,1 mM EDTA), majd ezt követően a megfelelő restrikciós enzimekkel emésztjük.

A fehérje N-terminális részét kódoló fragment amplifikálásához az alábbi két oligonukleotidot használjuk:

Oligo1: 5' GGGTAGAATTCAAAAATGGGCGTC
TCTGCTGTTCTA 3'

Oligo2: 5' AGTGACGAATTCGTGCTGGTGGAGA
TGGTGTCTG 3'

Az amplifikált fragmentet EcoRI restrikciós enzimmel emésztjük, majd a pTZ18R (a Pharmaciánál vásárolható) plazmid EcoRI hasítási helyére klónozzuk. A restrikciós hely térképezése és a nukleotid szekvencia meghatározása igazolja, hogy a fragment megfelelő. A kapott plazmid jele pGB925.

A második fragment amplifikálásához az alábbi két oligonukleotidot használjuk:

Oligo3: 5' GAGCACCAAGCTGAAGGATCC 3'

Oligo4: 5' AAACGACGAGCGTTGAGTGTGATTG
TTTAAAGGG 3'

Az amplifikált fragmentet BamHI és PstI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd ezt követően BamHI és PstI restrikciós enzimekkel emésztett pTZ18R plazmidba klónozzuk. A restrikciós térképezés és szekvenálás az mutatja, hogy a helyes fragmentet izoláltuk. A kapott plazmid jele pGB926.

Abból a célból, hogy teljes hosszúságú cDNS-t izoláljunk, a pGB925 plazmidot EcoRI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük, majd a fitázt kódoló DNS-t izoláljuk. Ezt a fragmentet klónozzuk a pGB926 plazmidba, amelyet előzőleg EcoRI és BamHI restrikciós enzimmel emésztettünk, így kapjuk a pGB927 plazmidot. A pGB927 plazmid tartalmazza a fitázt kódoló teljes hosszúságú cDNS-t, mérete körülbelül 1,8 kb.

3. példa

A pMOG23 bináris vektor készítése

Ebben a példában a pMOG23 bináris vektor készítését írjuk le (Escherichia coli K12 DH5 α törzsben, letétbe helyezve a Centraal Bureal voor Schimmel-cultures-nél, 1990. január 29-én, CBS 102.90 letéti szám alatt).

A pMOG23 bináris vektor (2. ábra) a Bin 19 vektor származéka (Bevan, M., 1984). A pMOG23 előállításához a Bin 19 vektort oly módon változtatjuk meg, hogy az nem lényeges a jelen találmány szempontjából, a molekuláris biológia szakterületen jártas szakember számára ismert módszereket alkalmazva.

Elsőként a bal oldali határoló szakaszt (LB) és a jobb oldali határoló szakaszt (RB) cseréljük ki, a neomicin-foszfotranszferáz II gén (NPTII gén) alapján. Másodszor, az NPTII orientációját fordítjuk meg, ezzel az LB irányában kapunk transzkripciót. Végezetül, a Bin 19-ben levő polilinkert helyettesítjük egy olyan polilinkerrel, amely az alábbi restrikciós enzim felismerési helyeket tartalmazza: EcoRI, KpnI, SmaI, BamHI, XbaI, SacI, XhoI és HindIII.

4. példa

Az Aspergillus ficuum fitáz cDNS-ének klónozása egy olyan expressziós konstrukcióban, amely konstitutív expressziót biztosít növényekben

Az Aspergillus ficuum fitáz génjét átalakítjuk, és egy olyan expressziós konstrukcióban klónozzuk, amely konstitutív expressziót biztosít a karfiol mozaikvírus 35S promotere után. Az expressziós konstrukció tartalmazza a növényi eredetű szignálpeptid-szekvencia kódoló információját.

A fitáz cDNS-t a pMOG29 plazmidban levő (az a) pontban írjuk le) expressziós szerkezetbe klónozzuk. Ezt követően a teljes konstrukciót a pMOG23 bináris vektorba építjük be, majd átviesszük Agrobacterium tumefaciens LBA4404 törzsbe.

A) A pMOG29 expressziós vektor készítése

A ROK1 expressziós konstrukciót (Baulcome et al., 1986) egy EcoRI/HindIII fragment formájában klónozzuk pUC18-ba. Ez a konstrukció tartalmazza a karfiol mozaikvírus (CaMV) 35S promotert egy EcoRI/BamHI fragment formájában, valamint a nopalín szintetáz (nos) transzkripció terminátort egy BamHI/HindIII fragment formájában. A promotor fragment a CaMV 35S promotor –800-tól a +1-es nukleotidig terjedő szekvenciáját tartalmazza. A benne lévő +1 pozíció a transzkripció iniciációs hely (Guilley et al., 1982). Az NcoI restrikciós hely előtt, a –512-es pozícióban levő szekvenciát deletáljuk, majd ezt a helyet egy EcoRI hasítási helyre változtatjuk. Ezt úgy hajtjuk végre, hogy a pUC18-ban levő expressziós konstrukciót NcoI-gyel hasítjuk. Az egyszálú végeket Klenow polimerázzal töltjük fel, majd EcoRI linkerrel ligáljuk. A kapott plazmidot EcoRI restrikciós enzimmel hasítjuk, ennek eredménye az eredeti NcoI hasítási hely előtt levő 35S promotor szekvenciákat hordozó EcoRI fragment deléciója. A BamHI/HindIII fragmentet, amely a nos terminátort tartalmazza, egy szintetikus DNS fragmenttel helyettesítjük (az A dup-

lex oligonukleotid, 4. ábra), amely a lucerna mozaikvírus (A1MV) RNA4 leader szekvenciáját tartalmazza (Brerode et al., 1980). Ezt úgy hajtjuk végre, hogy először BamHI, majd HindIII restrikciós enzimmel hasítjuk, majd ligáljuk a szintetikus DNS fragmentet. A BamHI restrikciós helyet és az előtte levő három nukleotidot helyspecifikus mutagenézissel távolítjuk el. A kapott plazmidba a nos terminátort szekvenciát tartalmazó BamHI/HindIII fragmentet újra beviesszük. A β -glükuronidáz kódoló gént (eredete a pRAJ 275 plazmid; Jefferson, 1987) egy NcoI/BamHI fragment formájában ligáljuk, így kapjuk a pMOG 14 plazmidot. A szakirodalomból ismert, hogy a –343 és –90 bázisok közötti szekvencia duplikálódása megnöveli a –35S promotor aktivitását (Kay et al., 1987). Ahhoz, hogy egy promotor fragmentet egy dupla, úgynevezett enhancer szekvenciával kapjuk meg, a következő, a szakterületen jártas szakember számára ismert lépéseket hajtjuk végre. A pMOG14 plazmidból az enhancer fragmentet egy AccI/EcoRI fragment formájában izoláljuk, majd ezt követően Klenow polimerázzal tompavégűvé tesszük. A kapott fragmentet egy EcoRI restrikciós enzimmel hasított és tompavégűvé tett pMOG14 plazmidba juttatjuk be, oly módon, hogy a tompavégűvé tett EcoRI és AccI hasítási helyek egy új EcoRI hasítási helyet hoznak létre. A keletkező plazmid (pMOG18) és 35S promotert egy dupla enhancer szekvenciával együtt tartalmazza, egy expressziós konstrukcióban levő A1MV RNA4 leader szekvenciával és a nos terminátorral együtt egy EcoRI/HindIII fragmenten. Végezetül, a β -glükuronidáz kódoló NcoI/BamHI fragmentet a B szintetikus DNS fragmenttel helyettesítjük (4. ábra), amely a PROB12 cDNS-ből származik (Cornelissen et al., 1986). Ez a B fragment a Samsun NN dohány PR fehérje PR-S szignál peptidjét kódolja. Egy nukleotid megváltoztatásával egy SphI hasítási helyet hozunk létre a szignál peptidet kódoló DNS szekvenciában. Ez a változtatás nem változtatja meg a kódolt PR-S szignál peptid aminosav szekvenciáját. A kapott plazmid jele pMOG29 (8. ábra).

B) Az Aspergillus ficuum fitáz génjének klónozása a bináris vektorban

A C jelű duplex oligonukleotidot (4. ábra) az SphI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztett pMOG29 plazmidba klónozzuk, így kapjuk a pMOG407 plazmidot. Az oligonukleotid duplex tartalmazza a PR-S szignál-peptid utolsó két aminosavát kódoló szekvenciát, majd ezt követően az érett fitáz első hat aminosavát kódoló információkat.

A pGB927 plazmidot, amely a teljes hosszúságú fitáz cDNS-t tartalmazza, részlegesen emésztjük XhoI, és teljesen megemésztjük PstI restrikciós enzimmel. Az érett fitáz 6. aminosavától kezdődően az érett fitáz kódoló DNS szakaszt tartalmazó XhoI/PstI fragmentet XhoI és PstI restrikciós enzimekkel linearizált pMOG407 plazmidba klónozzuk, így kapjuk a pMOG407 plazmidot. A teljes konstrukciót, amely a kimerá fitáz gént tartalmazza, egy EcoRI/HindIII fragment formájában beépítjük az EcoRI és HindIII

restrikciós enzimekkel linearizált pMOG23 bináris vektorba. A kapott pMOG413 bináris plazmidot mobilizáljuk, egy háromszülős keresztezés során, az *Escherichia coli* K-12 RK2013 törzsszel (ez tartalmazza a pRK2013 plazmidot) (Ditta et al., 1980), *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe, amely a T DNS növénybe való transzferéhez szükséges virulencia géneket hordozó plazmidot tartalmazza.

5. példa

Kiméra fitáz gén tranziens expressziója dohány protoplasztokban

Dohány protoplasztokat transzformálunk a konstitutív CaMV fitáz promotor szabályozása alatt álló kiméra fitáz gént tartalmazó plazmid DNS-sel. 72 óra elteltével a kezelt protoplasztokat megvizsgáljuk a bevitt fitáz gén tranziens expressziója szempontjából, a fitázaktivitás-vizsgálatot alkalmazva.

A sterilen növesztett 1–2 hónapos dohánynövényekből (*Nicotiana tabacum* SR1) protoplasztokat készítenek. A teljes eljárást Rodenburg és munkatársai közlik (1989). A transzformáláshoz 5×10^5 protoplasztot elektroporálunk 40 μ g pMOG417 plazmid DNS-sel. Az elektroporáció után a protoplasztokat ülepítjük, és 3 ml felülúszót éjszakán át dializálunk főlegesen levő vízzel szemben. A dializátumot fagyaszttva szárítjuk, majd 300 μ l 25 mM nátrium-acetát pufferben (pH=5,5) szuszpendáljuk. A vizsgálatot ezután oly módon hajtjuk végre, amint az a 10. példában részletesen le van írva, azzal az egyetlen eltéréssel, hogy a 250 mM glicin HCl puffer (pH=2,5) helyett 25 mM nátrium-acetát (pH=5,5) puffert használunk.

Ezekben a kísérletekben egy fitáz egységet úgy definiálunk, mint azt az enzimmennyiséget, amely 1,5 mM nátrium-fitát oldatból egy perc alatt 37 °C-on, pH=5,5-on 1 μ mol foszfátot szabadít fel.

A kezeletlen protoplasztokban nincs kimutatható aktivitás. A pMOG417 plazmiddal elektroporált protoplasztok 0,26 PFU (fitáz egység, lásd a 10. példát) aktivitást mutatnak a felülúszóban levő fehérje milligrammjára számítva.

6. példa

Egy kiméra fitáz gén stabil expressziója dohánynövényekben, a CaMV 35S promotor szabályozása alatt

A dohányt úgy transzformáljuk, hogy növényi szövetet együtt tenyésztünk *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsszel, amely a CaMV 35S promotor szabályozása alatt levő kiméra fitáz gént hordozó pMOG423 bináris vektort tartalmazza. A transzformáció végrehajtásához dohány (*Nicotiana tabacum*) levélkorongokat tenyésztünk együtt Horsch és munkatársai módszerével (1985). A transzgenikus növényeket azokból a hajtásokból regeneráljuk, amelyek szelekciós táptalajon nőnek (100 mg/liter kanamicin), meggyökereztetjük őket, és talajra visszük át őket. A fiatal növényeknek vizsgáljuk az NPTII aktivitását (kanamicin rezisztencia) érettségig felneveljük őket, hagyjuk, hogy önmagukat beporozzák, és magokat termeljenek.

Abból a célból, hogy meghatározzuk a transzgenikus magvakban található fitáz mennyiségét, körülbelül 50 mg-os mennyiséget veszünk, és jéghideg mozsárban eldörzsöljük 1 ml 25 mM nátrium-acetát pufferben (pH=5,5). A centrifugálás után a felülúszót a tranziens vizsgálatoknál leírt módszerrel vizsgáljuk meg. 32 függetlenül transzformált dohánynövényben a magban levő oldható összfehérje 0,4%-át kitevő maximális fitáz expressziós szintet figyelhetünk meg. A transzformálatlan növényekben nincs megfigyelhető fitáz aktivitás.

Két transzgenikus növényvonalat a 423.25-öst és a 413.32-est választjuk ki azon az alapon, hogy jól expresszálódik bennük a fitáz a magvakban (körülbelül 0,4%).

7. példa

*Az *Aspergillus ficuum* fitáz cDNS-ének klónozása egy magspecifikus expressziós konstrukcióban*

Egy expressziós konstrukciót állítunk elő, oly módon, hogy magspecifikus expressziót kapjunk, a *Brassica napus* kruciferin 12S tartalék fehérjéjének génjéből származó szekvenciákat alkalmazva (cruA; Ryan et al., 1989). Ezeket a szekvenciákat hasonló magspecifikus génekből származó szekvenciákkal helyettesíthetjük, ezzel a jelen találmány tárgyával azonos célt érhetünk el.

A fitáz cDNS-t klónozzuk az expressziós konstrukcióba. Végül az egész konstrukciót bejuttatjuk *Agrobacterium tumefaciens*-be, amelyet a transzformáláshoz használunk. Bármely egyéb, számunkra fontos fehérje génjének vagy cDNS-ének klónozása esetében a klónozást lényegében ugyanúgy végezzük, mint ahogy az előzőekben a fitáz cDNS-re leírtuk.

Az ebben a példában említett összes *Escherichia coli* transzformáláshoz az *Escherichia coli* K-12 DH5 α törzset használjuk.

A) Az expressziós konstrukció előállítás

A magspecifikus expresszióhoz használt expressziós konstrukció készítéséhez a *Brassica napus* cv. Jet Neuf kruciferin A (cruA) gén promotor és terminátor szekvenciáját PCR technológia alkalmazásával megsztetizáljuk izolált genomiális DNS-ről, mint templátról (Mettler, I. J., 1987). Ez a gén magspecifikus expressziót mutat, kódoló valamint határoló szekvenciáit meghatározták (Ryan et al., 1989).

Két oligonukleotid készletet szintetizálunk. Az egyik lehetővé teszi a cruA 5' határoló régió, valamint a szignál peptid kódoló szekvencia egy részének amplifikálását egy EcoRI/NcoI fragment formájában:

5' GTTCGGAATTCGGGTTCCGG 3' és 5' AACTGTTGAGCTGTAGAGCC 3'

A másik, a 3' határoló szekvenciának egy BglII/HindIII fragment formájában való amplifikálásához:

5' CTTAAGATCTTACCCAGTGA 3' és 5' CGGAGAAGCTTGCATCTCGT 3'

Az oligonukleotidokat úgy terveztük meg, hogy alkalmas restrikciós hasítási helyeket tartalmazzanak a végükön, hogy ezzel lehetővé váljon az expressziós konstrukció közvetlen összeállítása, a fragmentek restrikciós enzimekkel való emésztése után.

A *cruA* gén 5' fragmentjét, amely magában foglalja a szignál peptidet kódoló szekvencia 54 nukleotidját, az *EcoRI* és *NcoI* restrikciós enzimekkel hasított pMOG445 vektorba klónozzuk (E duplex oligonukleotid, 4. ábra, a pUC18 vektorba klónozza, *SstI* és *EcoRI* restrikciós enzimekkel linearizálva), így kapjuk a pMOG 424 vektort. A D szintetikus duplex oligonukleotidot, amely tartalmazza a *Brassica napus* kruciferin szignál szekvenciájának utolsó 5 kódoló tripletjét, az érett fitáz 1–6 aminosavát kódoló szekvenciát, és egy többszörös klónozó helyet, az *NcoI* és *HindIII* restrikciós enzimekkel hasított pMOG424 vektorba klónozzuk. A kapott vektor jele pMOG425. A 3' *cruA* PCR fragmentet egy *BglII/HindIII* fragment formájában klónozzuk *BglII* és *HindIII* restrikciós enzimekkel emésztett pMOG425 plazmidba, így kapjuk a pMOG426 vektort.

B) Az *Aspergillus ficuum* fitáz génjének klónozása a bináris vektorban

A pGB497 plazmidot, amely az *Aspergillus ficuum* fitáz gén teljes hosszúságú kódoló szekvenciáját tartalmazza, részlegesen emésztjük *XhoI* enzimmal, és teljesen megemésztjük *PstI* restrikciós enzimmal. Az *XhoI/PstI* fragmentet, amely a 6-os aminosavtól kezdődően tartalmazza az érett fitázt kódoló DNS szekvenciát, a pMOG426 vektorba klónozzuk, amelyet *XhoI* és *PstI* restrikciós enzimmal emésztettünk. A keletkező pMOG428 vektorból a teljes, a kiméra fitáz gént tartalmazó konstrukciót egy *EcoRI/HindIII* fragment formájában beépítjük a pMOG23 bináris vektorba, amelyet *EcoRI* és *HindIII* restrikciós enzimekkel linearizáltunk. A kapott, pMOG429 bináris vektort (5. ábra), az *Escherichia coli* K–12 RK2013 törzsszel (amely a pRK2013 plazmidot tartalmazza) (Ditta et al., supra) egy háromszülős keresztezés során mobilizáljuk, az *Agrobacterium* LBA4404 törzsbe (Hoekema et al., 1983, supra), amely egy olyan plazmidot hordoz, amely tartalmazza a T DNS növényekbe való átviteléhez szükséges virulencia géneket.

8. példa

A fitáz stabil magspecifikus expressziója dohánymagvakban, a kruciferin promotor szabályozása alatt

Az *Agrobacterium* LBA4404 törzset, amely a pMOG429 bináris vektort tartalmazza, benne a fitáz cDNS a kruciferin promotor szabályozása alatt, használjuk a transzformációs kísérletekben. A dohány (*Nicotiana tabacum* SR1) transzformálását úgy hajtjuk végre, hogy a levélkorongokat együtt tenyésztjük Horsch és munkatársai eljárása szerint (1985). A transzgenikus növényeket olyan hajtásokról szelektáljuk, amelyek szelekciós táptalajon nőnek (100 mg/liter kanamicin). A fiatal növényekben vizsgáljuk az NPTII aktivitást (kanamicin rezisztencia), teljes érettségig felneveljük, hagyjuk hogy önmagukat beporozzák, majd termeljenek magvakat. Az egyes transzformánsokból származó magvakat egyesítjük, majd a magmintha egy részében megvizsgáljuk a fitáz aktivitást. Azokból a klónokból, amelyek a legmagasabb expressziós szintet mutatják a transzformálatlan kontroll magvak-

hoz viszonyítva, a megmaradó magvakat kanamicinen (200 mg/liter) csíráztatjuk, szelektáljuk őket, és azoknak a növényeknek a nagy mennyiségben való előállítására használjuk, amelyek a legnagyobb mennyiségben képesek a fitáz előállítására a magvaikban. Ezeket lehet azután használni, például az emésztési kísérletekben.

A transzgenikus magvakban talált fitáz aktivitás meghatározásához körülbelül 50 mg magot veszünk, és egy jéghideg dörzscsészében eldörzsöljük 1 ml 25 mM nátrium-acetát pufferrel (pH=5,5). A centrifugálás után a felülúszót a tranziens vizsgálatnál leírt módon vizsgáljuk. 55 függetlenül transzformált dohánynövényben az összes oldható magfehérjére vonatkoztatva 0,15%-os maximális fitáz expressziós szintet figyeltünk meg. A fitázaktivitás nem volt kimutatható a transzgenikus növények szárában, gyökereiben és ágaiban. Fitázaktivitás nem mutatható ki a transzformálatlan növényekben sem.

9. példa

Repce transzformálása

Ebben a példában a repce olyan transzformálását írjuk le, melynek során a növényi szövetet együtt tenyésztjük a kiméra fitáz gént hordozó bináris vektort tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens*-sel. A transzgenikus növényeket az antibiotikum rezisztencia alapján lehet szelektálni. A transzgenikus növényekben vizsgálhatjuk a fitáz aktivitását. A magas szinten expresszálókat alaposabban vizsgáljuk, és a további kísérletekben alkalmazzuk.

Ugyanazt a bináris vektorban levő kiméra fitáz konstrukciót (pMOG429) mobilizáljuk *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe, ahhoz hasonló módon, mint amit a 7. példában leírtunk. Ezt a törzset használhatjuk repce (*Brassica napus* cv. Westar) transzformálására. Ebből a célból 5–6 hetes, éppen virágzás előtt álló növényből vett, felületen sterilizett szárdarabokat veszünk, 24 óra hosszat előkondicionáljuk MS táptalajban (Fry et al., 1987) 1 mg/liter BAP-pal, majd 48 óra hosszat együtt tenyésztjük *Agrobacterium*-mal, ugyanazt a táptalajt tartalmazó friss lemezekben. A transzgenikus növénykezdemények azokról a hajtásokról regenerálhatók, amelyek nőnek szelekciós táptalajon (500 mg/liter karbenicillin, 40 mg/liter paromomicin), majd tovább elemezzük a 8. példában dohánnyra leírt módon.

10. példa

A fitázaktivitás vizsgálata

A 413.25-as *Nicotiana tabacum* növényvonalból származó 25 mg magot megőrölünk, amelyben összesen körülbelül 0,25 PTU van. (PTU= fitázegység. Egy egység fitázaktivitást úgy definiálunk, mint azt az enzimmennyiséget, amely 1,5 mM nátrium-fitátból 1 μ mol/perc sebességgel (37 °C, pH=2,5) szabadít fel szervezetenlen foszfátot.

A megőrölt magokat 50 ml össztérfogatú 250 mM glicin/HCl pufferben (pH=2,5) inkubáljuk, amely 0,86 g nátrium-fitát $\times$ 11 H₂O-t tartalmaz. Jóllehet az *Aspergillus* fitáz mind 2,5-ös, mind 5,5-ös pH optimum mellett expresszál, az alacsonyabb pH-t választjuk, hogy a növény fitázaktivitását kizárjuk.

A kapott elegyet 15 illetve 60 percig inkubáljuk 37 °C-on. A reakciót úgy állítjuk el, hogy az inkubált reakcióelegyből 5 ml-t teszünk 5 ml 10%-os TCA-ba (triklór-ecetsav). Ezután 10 ml indikátor reagenst [3,66 g vas(II)-szulfát –7 víz, 50 ml ammónium-molibdát oldatban 2,5 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O és 8 ml koncentrált kénsav, 250 ml-re hígítva desztillált vízzel] adunk a leállított enzimoldathoz. A kék szín intenzitását spektrofotometriásan mérjük 700 nm-en.

A T=0 időpontban mért szervesetlen foszfáttartalom szolgál kontrollként.

A mérések a felszabadított foszfát mennyiségét jelzik, a 0–1 mM koncentrációtartományban levő foszfát kalibrációs görbe alapján

11. példa

A megőrölt Nicotiana tabacum magvak inkubálása táppal

Egy tipikus kísérletben 0,25 g oldószerrel extrahált szójalisztet inkubálunk 25 mg őrlött Nicotiana tabacum magvakkal (413.25-ös sejtvonal), amely körülbelül 0,25 PTU-t tartalmaz a fentiek szerint meghatározva, azzal az eltéréssel, hogy nátrium-fitátot adunk hozzá. Ebben az esetben a hozzáadott inkubáló anyag 410 ml puffer és 90 ml víz elege.

A foszfát felszabadulását fitátból oldószerrel extrahált szójalisztben, a 6. ábrán mutatjuk be. Hozzáadott őrlött mag nélkül nincs megfigyelhető aktivitás.

Egy látszólag azonos kísérletben hasonló eredményeket kapunk kukorica glutén táppal is, mint szubsztátummal. Az eredményeket a 6. ábrán mutatjuk be.

Nincs megfigyelhető aktivitás az őrlött magok távollétében, illetve akkor, ha a hozzáadott magok nem tartalmaznak fitázaktivitást.

12. példa

A fitázt tartalmazó transzgenikus magvak in vitro vizsgálata olyan körülmények között, amelyek a szárnyasok emésztőrendszerét szimulálják

Hogy felbecsüljük a transzgenikus dohánymagvakban termelt fitáz hatékonyságát, az Aspergillusból származó fitáz aktivitását olyan modellben határozzuk meg, amely a szárnyasok emésztőrendszerében található körülményeket utánozza.

Egy standard szárnyastápmintát először 1g/15 ml víz koncentrációban inkubálunk 60 percig 39 °C-on, hogy ezzel szimuláljuk az állatokban előforduló körülményeket a terményben. Ezt követően 5 ml pepszinoldatot (Merck: 5,28 g/l, pH=3,0, sósavval beállítva) adunk hozzá, a pH értéket sósavval pH=3,0-ra állítva, majd az inkubálást további 90 percig folytatjuk ugyanazon a hőmérsékleten, hogy a gyomorban előforduló körülményeket szimuláljuk.

Az inkubációs periódus során mintákat veszünk, hogy meghatározzuk a tápban levő fitátból felszabadult foszfát mennyiségét.

A gomba fitáz hatása nyilvánvaló a 10. ábrából. A fitáz dózist 250 PTU/kg tápról 1 000 PTU/kg tápra növelve, a tápmintából megnövekedett mennyiségű foszfát szabadul fel.

Ha egy transzgenikus dohánymagmintát (413.25 vagy 413.32 vonalak, dörzscsészében eldörzsölve alkalmazunk a gomba fitáz helyett, hasonló mértékben foszfát felszabadulást figyelhetünk meg (11. ábra). Kontroll dohánymagot is vizsgáltunk, amely nem tartalmaz fitázt. A vak kontrollal összehasonlítva nem volt foszfát felhalmozás megfigyelhető.

Az 50 g transzgenikus dohánymag/kg táppal kapott eredményeket összehasonlítva azokkal, amelyeket az 500–750 PTU/kg táppal kaptunk, azt az eredményt kapjuk, hogy 1 kg dohánymag körülbelül 12 PTU-nak felel meg ebben az in vitro szárnyas emésztési modellben.

13. példa

15 Vizsgálatok állatokban

A vizsgálatokat broilerekkel végezzük, hogy igazoljuk a növényi magvakban expresszáldott fitáz hatékonyságát, valamint bármely, a dohánymagvakból származó negatív hatás hiányát a zootechnikai eredményekre.

50 A fitázt expresszáldó dohánymagvakat és kontroll magvakat begyűjtjük. A magvakat 100 grammos részletekben megőröljük (Retch-mill ZM1) és a szitáláshoz egy olyan szitát alkalmazunk, amelynek a pórús mérete 500 µm, és vigyázunk arra, hogy a magvakat hűtve tartsuk.

25 Egynapos broiler kakasokat (Hybro) tartunk kétállatos ketrecekben (0,45 m²). Az első két napban a teremhőmérséklet 32 °C, majd az első héten 4 °C-kal csökkentjük. Minden ezt követő héten a hőmérséklet 2 °C-kal csökkentjük. A broilereket egy óra megvilágítás és három óra sötétséget váltogatva tenyésztjük.

30 Az állatokat New Castle betegséggel szemben egynapos korukban vakcináljuk, Clone 30 vakcina alkalmazásával. A kísérletek során a broilereket a kísérleti táppal etetjük, tetszés szerinti mennyiségben. A növekedési és a táp/súlynövekedés arányt a kísérleti időszakban mérjük. Az összes foszfor látszólagos hozzáférhetőségét háromnapos periódusokban mérjük, amelynek során a tápfogyasztást szárazanyag-felvétellel mérjük, az ürüléket pedig teljes egészében összegyűjtjük.

40 A foszfor látszólagos hozzáférhetőségét úgy határozzuk meg, mint azt a különbséget, ami a felvett foszfor és a kiürített foszfor mennyisége között van.

Az alábbi, fitáz hozzáadása nélküli kontrollétrendet alkalmazzuk:

	Ca	Össz-foszfor	Fitát-foszfor
Étrendek	(%)	(%)	(%)
1	0,60	0,45	0,30
2	0,75	0,60	0,30
3	0,90	0,75	0,30

Foszfátot nem adunk az 1-es étrendhez (alapétrend).

55 Kalciumot és foszfort vízmentes dikalcium-foszfát és monoammónium-foszfát 5:1 arányú elegyével viszünk be a 2-es és 3-as étrendekbe. Az összes kísérleti étrendet az alapétrend kiegészítésével állítunk elő (1. Táblázat).

60 A 4-es kísérleti étrend tartalmaz mikrobiális eredetű fitázt 400 TPU/kg táp mennyiségben, Van Gorcom és munkatársai által leírt módon előállítva (1991).

Az 5-ös kísérleti étrend hasonlít a 4-eshez, de őrölt nem transzgenikus dohánymagvakat adunk a tápkeverékhez, ezzel a 3 kg/90 kg táp végső arányt állítja be.

A 6-os kísérleti étrend is hasonló a 4-eshez, de 3 kg transzgenikus dohányból származó (413.25 vonal), megőrölt magot adunk 90 kg táphoz, így kapjuk a 400 PTU/kg táp végkoncentrációt.

A kísérletet 176 broilerrel végezzük 16 ketrec-csoportban (11 per ketrec-csoport) 24 napos korig. A kezeléseket (étrendek) kétszer megismételjük, és az egyes sorokban levő ketrecekhez véletlenszerűen rendeljük hozzá.

A foszfor felhasználhatóságát 21–24 napos kortól mérjük.

A foszfor felhasználhatóságát és a 4-es, 5-ös és 6-os étrenden tartott állatok növekedése a fitáz hozzáadásának pozitív hatását mutatja (2. táblázat). A 4-es, 5-ös és 6-os étrendek összehasonlítása azt mutatja, hogy a dohánymagvak belekeverése az étrendbe összefér a mikrobiális fitáz működésével haszonállatok, például broilerek emésztési rendszerében, és nem mutat negatív hatást a zootechnikai eredményekre.

1. táblázat

Broilerekkel végzett kísérletek alapétrendjének összetétele

Adalékanyagok	Mennyiség (g/kg)
Sárga kukorica	28,0
Cirok (alacsony tannintartalom)	200,0

	Adalékanyagok	Mennyiség (g/kg)
5	Napraforgóliszt (oldószerrel extr.)	80,0
	Szójaliszt (oldószerrel ext. 48% fehérje)	350,0
	Szójaolaj	58,5
10	Vitaminok*	5,0
	Ásványi anyagok*	15,0
	Mészke	1,0
	Szintetikus metionin	1,0
15	Cr ₂ O ₃	0,5
		1 001,0
20	ME (MJ/kg)	13,1
	Lizin	12,9
	Metionin+cisztein	9,1
	Kalcium	6,0 (6,0–6,6)**
	Össz-foszfor	4,5 (4,7–4,7)**
25	Szerves fitikus foszfor	3,0 (3,1–3,1)**

* Az egy kg táppal bevitt mennyiség: 12 000 IU A vitamin; 2 000 IU D₃ vitamin; 5 IU E vitamin; 1,5 mg K₃ vitamin; 1 mg tiamin; 5 mg riboflavin; 1 mg piridoxin; 30 mg nikotinsav; 7,5 mg D-pantoténsav; 0,015 mg B₁₂ vitamin; 0,5 mg folsav; 350 mg klorin-klorid; 75 mg etoxiquin; 9,5 g CaCO₃; 2,5 g NaCl; 0,25 g FeSO₄; 0,24 g MnSO₄; 45 mg CuSO₄; 60 mg ZnSO₄; 105 mg KI elegy.

** () Az 1-es illetve 2-es kísérletekhez elemezve.

2. táblázat

A fitáz hatása az összes foszfát és kalcium látszólagos felhasználhatóságára, a P tartalom a trágyában és a broilerek teljesítménye

Étrendek	Ca/P (g/kg)	Hozzáadott fitáz (U/kg)	Felhasználhatóság (%) 21–24. nap		A P mennyisége a trágyában (g) per kg táp felv.	Növ. 0–24 (g)
			P	Ca		
1	6/4,5	0	49,8	47,2	2,7	338
2	7/5,6	0	45,6	48,9	3,8	592
3	9/7,5	0	44,6	46,9	4,9	683
4	mint az 1.	400	60,5	58,6	2,1	620
5	mint az 1.	0	48,5	48,0	2,7	340
6	mint az 1.	400	60,2	59,3	2,1	615

14. példa

A *Bacillus licheniformis* α -amiláz génjének klónozása egy expressziós kazettában, konstitutív expresszió céljából

Ebben a példában a *Bacillus licheniformis* α -amiláz génjét alakítjuk át, és egy olyan expressziós vektorban klónozzuk konstitutív expresszió céljából, amely tartalmaz még egy növényi eredetű szignálpeptid szekvenciát

kódoló szakaszt. Végső lépésként az egész konstrukciót egy bináris vektorban klónozzuk, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 törzsbe visszük át, amelyet a számunkra érdekes növény transzformálására használunk. Bármely más cDNS-t vagy gént ahhoz hasonló módon klónozzhatunk, mint az α -amiláz génre az előzőekben leírtunk.

A példában említett összes transzformációt *Escherichia coli* K-12 DH5 α törzsszel végezzük.

A) *Bacillus licheniformis* α -amiláz génjének átalakítása

A *Bacillus licheniformis*-ből származó α -amiláz gént (7. ábra), amely a pPROM54 *Bacillus* vektorban található (letétbe helyezve a Centraal Bureau voor Schimmelcultuur-nál, 1985. november 5-én, CBS 696.85 letéti sorszám alatt), XbaI és BclI restrikciós enzimekkel emésztjük. Az XbaI/BclI fragmentet XbaI és BamHI restrikciós enzimekkel linearizált pUC18 vektorba klónozzuk, így kapjuk a pMOG318 plazmidot. Egy Sall/BamHI fragmentet szintetizálunk PCR technikával, a pMOG318-at használva templatként, a BamHI hasítási helyet egy nem pontosan illeszkedő indító molekulával hozva létre (lásd 7. ábra). A Sall/BamHI PCR fragmentet a pIC-19R plazmidba klónozzuk (Marsh et al., 1984), amelyet Sall és BamHI restrikciós enzimekkel emésztünk, így kapjuk a pMOG319 plazmidot. A pMOG318-ból származó Sall fragmentet, amely tartalmazza az α -amiláz gén 5' végét (a pUC18-ban meglevő Sall hasítási hely felhasználásával) a Sall restrikciós enzimmel linearizált pMOG319 plazmidba klónozzuk. Ennek eredménye a pMOG320 plazmid, amely a teljes α -amiláz gént tartalmazza.

B) pMOG29 vektor előállítás

A pMOG29 vektort a 4 (A) példában leírt módon állítjuk elő.

C) Az α -amiláz gén klónozása *Bacillus licheniformis*-ből a bináris vektorban

a pMOG320 plazmidot HgaI és BamHI restrikciós enzimekkel emésztjük. A HgaI/BamHI fragmentet, amely a 9. aminosavtól kezdődően kódolja az érett α -amilázt, egy három fragmentes ligálással, a szintetikus F duplex oligonukleotiddal együtt (4. ábra) SphI és BamHI restrikciós enzimekkel linearizált pMOG29 plazmidba ligáljuk, ennek eredménye a pMOG321 plazmid. Az oligonukleotid duplex tartalmazza a PR-S szignálpeptidje utolsó 2 aminosavának kódoló információját, és az érett α -amiláz első 9 aminosavát kódoló információt. A teljes konstrukciót, amely a kiméra α -amiláz gént tartalmazza, az EcoRI és HindIII restrikciós enzimekkel linearizált pMOG23 bináris vektorba építjük be egy EcoRI/HindIII restrikciós fragment formájában. A kapott bináris plazmidot (pMOG227, 9. ábra) mobilizáljuk, egy háromszülős keresztezéssel, *Escherichia coli* RK2013 K-12 törzset alkalmazva erre a célra (amely tartalmazza a pRK2013 plazmidot) (Ditta et al., 1980), *Agrobacterium* LBA4404 törzsbe, amely tartalmazza a T DNS-nek növényekbe való átviteléhez szükséges virulencia géneket.

15. példa

A *bacillus licheniformis* α -amiláz stabil expressziója dohányban

Ebben a példában a dohányt transzformáljuk, oly módon, hogy a növényi szövetet együtt tenyésztjük olyan *Agrobacterium tumefaciens*-sel, amely egy kiméra α -amiláz gént hordozó bináris vektort tartalmaz. A transzgenikus növényeket az antibiotikum rezisztencia alapján szelektáljuk. A transzgenikus növények magvaiban vizsgáljuk az α -amiláz aktivitást. A maga-

san expresszáldókat alaposabban elemezzük, és a további kísérletekben ezeket használjuk.

Az *Agrobacterium* LBA4404 törzset (pMOG227) használjuk a transzformációs kísérletekben. A dohány (*Nicotiana tabacum* SR1) transzformálást úgy végezzük el, hogy a levélkorongokat együtt tenyésztjük Horsch és munkatársai módszerével (1985). A transzgenikus növényeket regeneráljuk azokból a hajtásokból, amelyek szelekciós táptalajon (100 μ g/ml kanamicin) nőnek. A fiatal növényekben megvizsgáljuk a NPTII aktivitást, érettségig felneveljük, hagyjuk, hogy önmagukat beporozzák és magot hozzanak. Az egyes transzformánsokból származó magvakat egyesítjük, és a magminta egy részében vizsgáljuk az α -amiláz aktivitás jelenlétét. A legmagasabb expressziós szinttel rendelkező klónokból (a nem transzformált kontroll magokhoz viszonyítva) a maradék magokat kanamicin jelenlétében (200 mg/l) csíráztatjuk (ezek transzgenikusak az α -amilázra nézve is), és a magvaikban legmagasabb szinten α -amilázt termelni képes növények tömeges előállítására használjuk. A megfigyelt maximális α -amiláz szint a mag összes oldható fehérjéjére vonatkoztatva 0,4%. Ezeket a magvakat lehet azután az emésztési kísérletekben alkalmazni.

16. példa

A magvakban levő α -amiláz alkalmazása keményítő elfolyósítására

A *Bacillus licheniformis* α -amilázt, dohány-magvakban expresszáva, alkalmazzuk keményítő elfolyósítására az alábbiak szerint: 100 g-t gyűjtünk mind az α -amilázt expresszáló, mind a kontroll dohánymagvakból. A magvakat egy malomban megőröljük (Retch-mill ZM1), és egy 250 μ m) pórusméretű szitán átszítáljuk, és ügyelünk arra, hogy a magvak hűtve maradjanak. Az α -amiláz tartalmuk meghatározása céljából a megőrölt magvakat 10 térfogat 0,5 M glicin (pH=9,0), 10 mM kalcium-klorid összetételű pufferrel extraháljuk, 30 percig 0 °C-on. A felülúszót használjuk az α -amiláz tartalom Phadebas módszerrel történő meghatározására (Pharmacia Diagnostics). Az egységekre mint TAU-ra hivatkozunk (termotabil α -amiláz egység).

Az elfolyósítási vizsgálatokat az alábbiak szerint végezzük: keményítőszörpöt [összetétele: 3,3 kg kukorica- vagy burgonyakeményítő, D. S. (szárazanyag) 88% (2,904 kg keményítő); 5,45 l víz; a szörp D. S. értéke 33% lesz; a pH értékét 6,5-re állítjuk 0,5 M kénsavval vagy 1 M nátrium-hidroxid-oldattal. Vagy őrölt magvakat vagy mikrobiális α -amilázt adunk hozzá olyan mennyiségben, amely megfelel 4,4 T. A. U./g D. S.-nek] melegítünk 100 °C-ra, amilyen gyorsan csak lehet, és ezt a hőmérsékletet 10 percig fenntartjuk. A szörp hőmérsékletét ezután 95 °C-ra csökkentjük, majd 2 óra hosszat ezen a hőmérsékleten tartjuk. Ezután a mintákat kénsavval pH=3,5-re savanyítjuk, majd forrásban levő vízfürdőbe helyezzük 10 percre, hogy leállítsuk az enzimaktivitást, mielőtt a DE (dextróz ekvivalensek) és hidrolízis mintázatot HPLC-vel meghatározzuk. A HPLC elemzéshez BIORAD HPX-42A oszlopot

használunk, ásványianyag-mentesített vizet használva eluálószerként.

A burgonya- és kukoricakeményítő hidrolízisével kapott oligoszaccharid mintázatot

- A) transzformált növényi magok;
- B) Maxamyl[®] (Bacillus licheniformis α -amiláz, a Gist-Brocades terméke, Delft, Hollandia); és
- C) Dexlo[®]RCL (Bacillus amyloliquefaciens α -amiláz a Gist-Brocades-tól)

felhasználásával előállítva hasonlítottuk össze (12. és 13. ábra). A transzformált növényi magvakkal és Maxamyl[®]-rel kapott oligoszaccharid mintázat azonos, mégis mindegyik különbözik attól, amelyet Dexlo[®]-rel kapunk, megerősítve, hogy Bacillus licheniformis α -amiláz termelődik a növények magvaiban. A növényi magvakkal kapott DE értékek (3. táblázat) a kereskedelmi elfogadható tartományban vannak (DE $\geq$ 12, előnyösen DE $\geq$ 16) (Reilly, 1985).

3. táblázat

Kukorica- és burgonyakeményítő hidrolízisével kapott Dextróz ekvivalens (DE) értékek

	Burgonya-keményítő DE	Kukorica-keményítő DE
Maxamyl [®] WL7000	18	16
Transzformált dohánymagvak	16	13
Nem transzformált dománymagvak	0	0
Dexlo [®] RCL	15	18

Jóllehet a jelen találmányt specifikus megvalósítási módjaira való hivatkozással írtuk le, a szakterületen jártas szakemberek számára világosnak kell lennie, hogy különböző változtatások hajthatók végre, és az egymással egyenértékű dolgok helyettesíthetők egymással anélkül, hogy eltérnénk a jelen találmány oltalmi körétől és szellemétől. Emellett számos módosítás hajtható végre, hogy egy adott helyzethez, anyaghoz, növényhez, maghoz, eljáráshoz vagy a találmány tárgyának, szellemének és oltalmi körének eljárási lépéséhez vagy lépéseihez alkalmazkodjunk. Az összes ilyen módosítás a megadott igénypontok oltalmi körébe tartozik.

A szabadalmi leírás szövegében található irodalmi hivatkozásokat az alábbi listában foglaljuk össze:

- Altenbach, S. B., Pearson, K. W., Meeker, G., Staraci, L. C. & Sun, S. S. M. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13, 513.
- Auffray & Rougeon (1980) *Eur. J. Biochem.* 107, 303–314.
- Barker, S. J., Harada, J. J. & Goldberg, R. B. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 458.
- Baulcombe, D. C., Saunders, G. R., Bevan, M. W., Mayo, M. A. & Harrison, B. D. (1986) *Nature* 321, 446.
- Bäumlein, H., Wobus, U., Pestell, J., & Kafatos, F. C. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 2707.

- Beachy, R. N., Chen, Z.-L., Horsch, R. B., Rogers, S. G., Hoffmann, N. J. & Fraley, R. T. (1985) *EMBO J.* 4, 3047.
- Bevan, M. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 8711.
- 5 Brederode, F. T., Koper-Zwarthoff, E. C. & Bol, J. F. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 2213.
- Bustos, M. M., Guiltinan, M. J., Jordano, J., Begum, D., Kalkan, F. A. & Hall, T. C. (1989) *Plant Cell* 1, 839.
- 10 Casey, R. & Domoney, C. (1987) *Plant Mol. Biol. Reporter* 5, 261.
- Chee, B. B., Klassy, R. C. & Slightom, J. L. (1986) *Gene* 41, 47.
- Cornelissen, B. J. C., Holft van Huijsduijnen, R. A. M. & Bol, J. F. (1986) *Nature* 321, 531.
- 15 Della-Cioppa, G., Kishore, G. M., Beachy, R. N. & Fraley, R. T. (1987) *Plant Physiol.* 84, 965.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. & Helinski, D. R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7347.
- 20 Dorel, C., Voelker, T. A., Herman, E. M. & Chrispeels, M. J. (1989) *J. Cell Biol.* 108, 327.
- Doyle, J. J., Schuler, M. A., Godette, W. D., Zenger, V., Beachy, R. N. & Slightom, J. L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9228.
- 25 Ellis, J. R., Shirsat, A. H., Hepher, A., Yarwood, J. N., Gatehouse, J. A., Croy, R. R. D. & Boulter, D. (1988) *Plant Mol. Biol.* 10, 203.
- Fischer, R. L. & Goldberg, R. B. (1982) *Cell* 29, 651.
- Fry, J. & Barnason, A. & Horsch, R. B. (1987) *Plant Cell Reports* 6, 321.
- 30 Gasser, C. S. & Fraley, R. T. (1989) *Science* 244, 1293.
- Goodman, R. M., Knauf, V. C., Houck, C. M. & Comai, L. (1987) *PCT/WO* 87/00865.
- Gordon-Kamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., O'Brien, J. V., Chambers, S. A. Adams Jr., W. R., Willets, N. G., Rice, T. B., Mackey, C. J., Krueger, R. W., Kausch, A. P. & Lemaux, P. G. (1990) *The Plant Cell* 2, 603.
- 40 Guillely, H., Dubley, R. K., Jonard, G., Balazs, E. & Richards, K. E. (1982) *Cell* 30, 763.
- Harada, J. J., Barker, S. J. & Goldberg, R. B. (1989) *Plant Cell* 1, 415.
- Hattori, T., Nakagawa, T., Maeshima, M., Nakamura, K., & Asahi, T. (1985) *Plant Mol. Biol.* 5, 313.
- 45 Hiatt, A., Cafferkey, R. & Boedish, K. (1989) *Nature* 342, 76.
- Higgins, T. J. V., (1984) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 191.
- 50 Higgins, T. J. V., Newbiggin, E. J., Spencer, D., Llewellyn, D. J. & Craig, S. (1988) *Plant Mol. Biol.* 11, 683.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J. & Schilperoort, R. A. (1983) *Nature* 303, 179.
- 55 Hoffman, L. M., Donaldson, D. D., Bookland, R., Rashna, K. & Herman, E. M. (1987) *EMBO J.* 6, 3213.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. & Fraley, R. T. (1985) *Science* 227, 1229.
- 60

- Iturriaga, G., Jefferson, R. A. & Bevan, M. W. (1989) *Plant Cell* 1, 381.
- Jefferson, R. A. (1987) *Plant Mol. Biol. Reporter* 5, 387. Jordano, J., Aloguera, C. & Thomas, T. L. (1989) *Plant Cell* 11, 855.
- Kay, R., Chan, A., Dayly, M. & McPerson, J. (1987) *Science* 236, 1299.
- Klee, H., Horsch, R. & Rogers, S. (1987) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 467.
- Krebbers, E. & Vandekerckhove, J. (1990) *TIBTECH*, 8, 1.
- Larkins, M. A. (1981) In: *The biochemistry of plants* Vol. 6 (Academic Press, San Diego: Stumpf, P. K. & Conn, E. E., eds.). Chapter 11. p. 471.
- Lee, B., Murdoch, K., Topping, J., Kreis, M. & Jones, M. G. K. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13, 21.
- Lycett, G. W., Delauney, A. J., Gatehouse, J. A., Gilroy, J., Croy, R. R. D. & Boulter, D. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11, 2367.
- Lycett, G. W., Croy, R. R. D., Shirsat, A. H. & Boulter, D. (1984) *Nucl. Acids Res.* 12, 4493.
- Mariani, C., de Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J., & Goldberg, R. B. (1990) *Nature* 347, 737.
- Marsh, J. L., Erfle, M. & Wykes, E. J. (1984) *Gene* 32, 481.
- Mettler, I. J. (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 346.
- Okamura, J. K., Jokufu, K. D. & Goldberg, R. B. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8240.
- Pang, P. P., Pruitt, R. E. & Meyerowitz, E. M. (1988) *Plant Mol. Biol.* 11, 805.
- Potrykus, I. (1990) *Bio/Technol.* 8, 535.
- Radke, S. E., Andrews, B. M., Moloney, M. M., Crough, M. L., Kridl, J. C. & Knauf, V. C. (1988) *Theor. Appl. Genet.* 75, 685.
- Reilly, P. J. (1985) In: *Starch Conversion Technology* (Marcel Dekker, Inc., New York: Van Beynum, G. M. A. & Roeles, J. A., eds.), Chapter 5, p. 101.
- Riggs, C. D., Hung, D. C., Lin, J. & Chrispeels, M. J. (1989) *Plant Sci.* 63, 47.
- Rodenburg, K. W., DeGroot, M. J. A., Schilperoort, R. A. & Hooykaas, P. J. J. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13, 711.
- Ryan, A. J., Royal, C. L., Hutchinson, J. & Shaw, C. H. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17, 3584.
- Scofield, S. R. & Crouch, M. L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12202.
- Schilperoort, R. A., Hoekema, A. & Hooykaas, P. J. J. (1984) *European Patent Application* No. 0 120 516.
- Sengupta-Gopalan, C., Reichert, N. A., Barker, R. F., Hall, T. C. & Kemp, J. D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3320.
- Shimamoto, K., Terada, R., Izawa, T. & Fujimoto, H. (1989) *Nature* 338, 274.
- Shotwell, M. A. & Larkins, B. A. (1989) In: *The biochemistry of plants* Vol. 15 (Academic Press, San Diego: Stumpf, P. K. & Conn, E. E., eds.). Chapter 7. p. 297.
- Sijmons, P. C., Dekker, B. M. M., Schrammeijer, B., Verwoerd, T. C., van den Elzen, P. J. M. & Hoekema, A. (1990) *Bio/Techol.* 8, 217.
- Slightom, J. L., Schaber, M. D. & Kramer, R. A. (1986) In: *Molecular biology of seed storage proteins and lectins* (Waverley Press, Baltimore: Shannon, L. M. & Chrispeels, M. J., eds.) *Am. Soc. Plant Physiol.* p. 183.
- Smith, J. J. & Raikhel, N. V. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13, 601.
- Vaara, T., Vaara, M., Simell, M., Lehmussaari, A. & Caransa, A. (1989) *European Patent Application* 0 321 004.
- Vandekerckhove, J., VanDamme, J., VanLijsebettens, M., Botterman, J., DeBlock, M., DeClerq, A., Leemans, J., Van Montagu, M. & Krebbers, E. (1989) *Bio/Technol.* 7, 929.
- van Gorcom, R. F. M., van Hartingsveldt, W., van Paridon, P. A., Veenstra, A. E., Luiten, R. G. M., Selten, G. C. M. (1991) *European Patent Application* 89202436.5, Publication No. 0 420 358, filed September 27, 1989.
- Vasil, V., Redway, F. & Vasil, I. K. (1990). *Bio/Technol.* 8, 429.
- Vitale, A. & Bollini, R. (1986) In: *Molecular biology of seed storage proteins and lectins* (Waverley Press, Baltimore: Shannon, L. M. & Chrispeels, M. J., eds.) *Am. Soc. Plant Physiol.* p. 175.
- Voelker, T. A., Herman, E. M. & Chrispeels, M. J. (1989) *Plant Cell* 1, 95.
- Vonder Haar, R. A., Allen, R. D., Cohen, E. A., Nessler, C. L. & Thomas, T. L. (1988) *Gene* 74, 433.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- 35 1. Eljárás egy *in vitro* reakció katalizálására, azzal jellemezve, hogy
- (i) transzgenikus – magvaiban egy enzim megnövelt mennyiségét tartalmazó – növényekből magvakat nyerünk,
- 40 (ii) az említett magvakat hozzáadjuk egy szubsztrátot tartalmazó reakcióelegyhez és
- (iii) az enzimet reagáltatjuk a reakcióelegyben lévő szubsztráttal.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve,
- 45 hogy az enzim egy heterológ enzim a nem transzgenikus, vad típusú növény számára.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a magvakat a reakcióelegyhez való hozzáadás előtt megőröljük.
- 50 4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az őrlést a magvaknak a reakcióelegyhez való hozzáadása után végezzük.
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az enzim egy hidroláz enzim.
- 55 6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a hidroláz enzim egy proteáz, celluláz, hemi-celluláz, foszfátáz, lipáz, pektináz, amiláz, lizozim, pellanáz vagy kitináz.
7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve,
- 60 hogy az enzim egy liáz.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a liáz egy pektinliáz.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzim egy izomeráz.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az izomeráz egy glükóz izomeráz.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzim egy fitáz, alfa-amiláz, cellobiohidroláz, endo-glukanáz, endo-xilanáz, endo-galaktnáz, alfa-galaktozidáz, arabinanáz, szerin-proteáz, kimozin, papain, gasztrikus lipáz, pektin-liáz vagy glükóz izomeráz.

12. Eljárás egy állat tápértékfelvételének javítására adott takarmányból vagy tápból, *azzal jellemezve*, hogy (i) transzgenikus – magvaiban egy enzim megnövelt mennyiségét tartalmazó – növényekből magvakat nyerünk, és

(ii) ezeket a magvakat az állattal megetetendő táphoz vagy takarmányhoz adjuk, amikor is az enzim képes a takarmányban vagy tápban egy emésztési reakciót katalizálni, amely emésztési reakció eredményeképpen a tápban lévő, a takarmányt vagy tápot emésztő állat számára hasznosítható komponensek mennyisége megnő.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az enzim egy fitáz, celluláz, hemicelluláz, pektináz vagy amiláz.

14. Eljárás egy *in vitro* reakció katalizálására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) transzgenikus – magvaiban legalább egy enzim megnövelt mennyiségét tartalmazó – növényekből magvakat nyerünk,

(ii) az említett magvakat hozzáadjuk egy vagy több szubsztrátot tartalmazó reakcióelegyhez, és

(iii) az enzimet reagáltatjuk a reakcióelegyben lévő egy vagy több szubsztráttal.

15. Eljárás transzgenikus – magvaiban legalább egy enzim megnövelt mennyiségét tartalmazó – növény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) előállítunk egy pMOG expressziós szerkezetet, amely egy mag specifikus szabályozó régiójának kontrollja alatt egy enzimet kódoló DNS-t tartalmaz,

(ii) transzformálunk egy növényi sejtet az említett expressziós szerkezettel, és

(iii) regeneráljuk a növényt, amely a magvaiban az említett enzim megnövelt mennyiségét tartalmazza közvetlen felhasználáshoz egy ipari eljárásban.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pMOG413 konstrukciót tartalmazó expressziós szerkezetet állítjuk elő.

17. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pMOG429 konstrukciót tartalmazó expressziós szerkezetet állítjuk elő.

18. A 15. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a pMOG227 konstrukciót tartalmazó expressziós szerkezetet állítjuk elő.

19. Eljárás egy pMOG413 konstrukció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) emésztjük a pGB927 plazmidot XhoI és PstI enzimekkel,

(ii) klónozzuk az XhoI/PstI fragmenst a pMOG407 plazmidba az XhoI/PstI helyeknél, előállítva így a pMOG417 konstrukciót, és

(iii) behelyezzük a teljes pMOG417 konstrukciót egy EcoRI/HindIII fragmensként a pMOG23 bináris vektorba, miáltal egy kiméra fitáz gént tartalmazó pMOG413 konstrukcióhoz jutunk.

20. Eljárás egy pMOG429 konstrukció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) emésztjük a pGB927 plazmidot XhoI és PstI enzimekkel,

(ii) klónozzuk az XhoI/PstI fragmenst a pMOG426 plazmidba az XhoI/PstI helyeknél, előállítva így a pMOG428 konstrukciót, és

(iii) behelyezzük a teljes pMOG428 konstrukciót egy EcoRI/HindIII fragmensként a pMOG23 bináris vektorba, miáltal egy kiméra fitáz gént tartalmazó pMOG429 konstrukcióhoz jutunk.

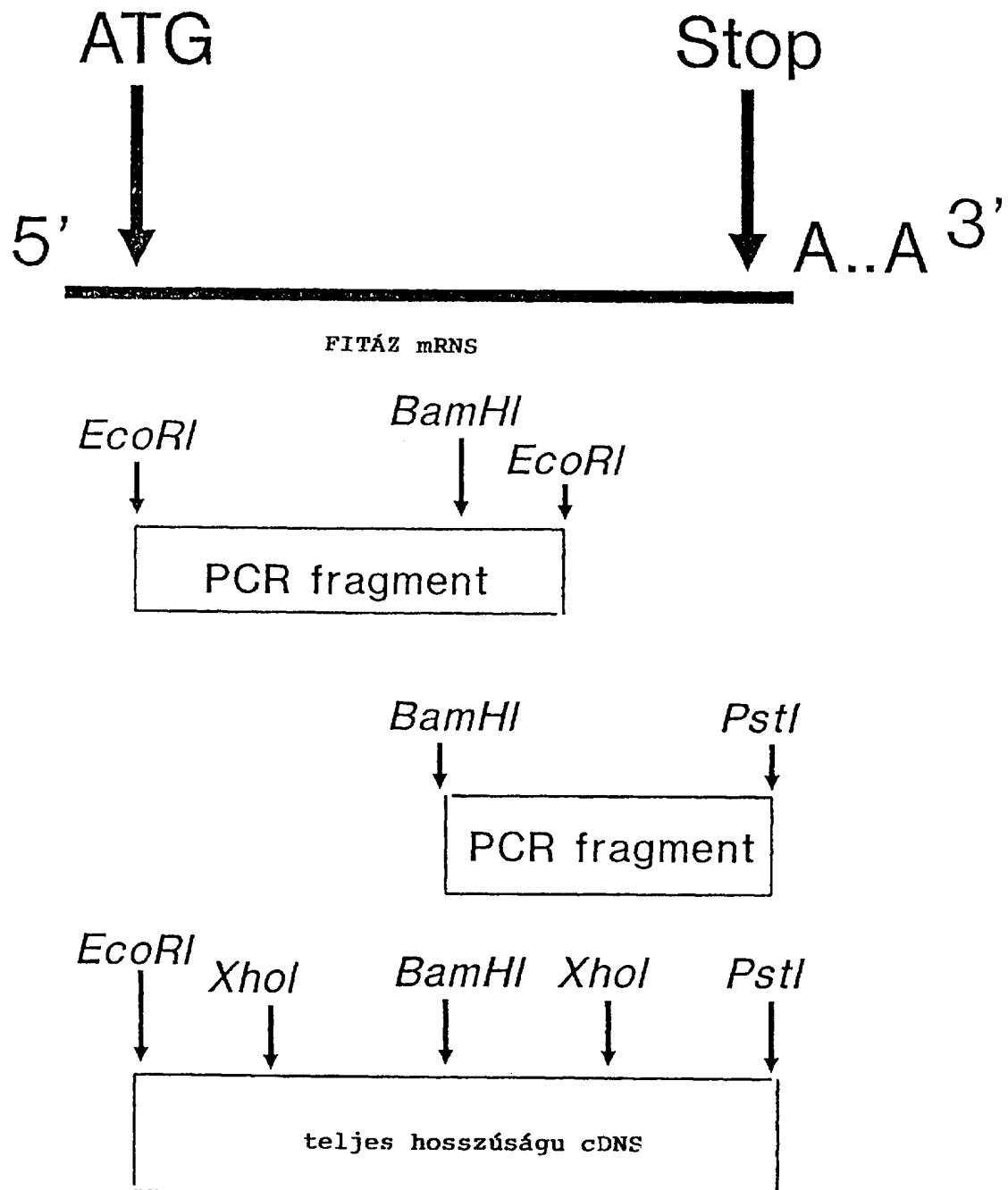
21. Eljárás egy pMOG227 konstrukció előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

(i) emésztjük a pGB320 plazmidot HgaI és BamI enzimekkel,

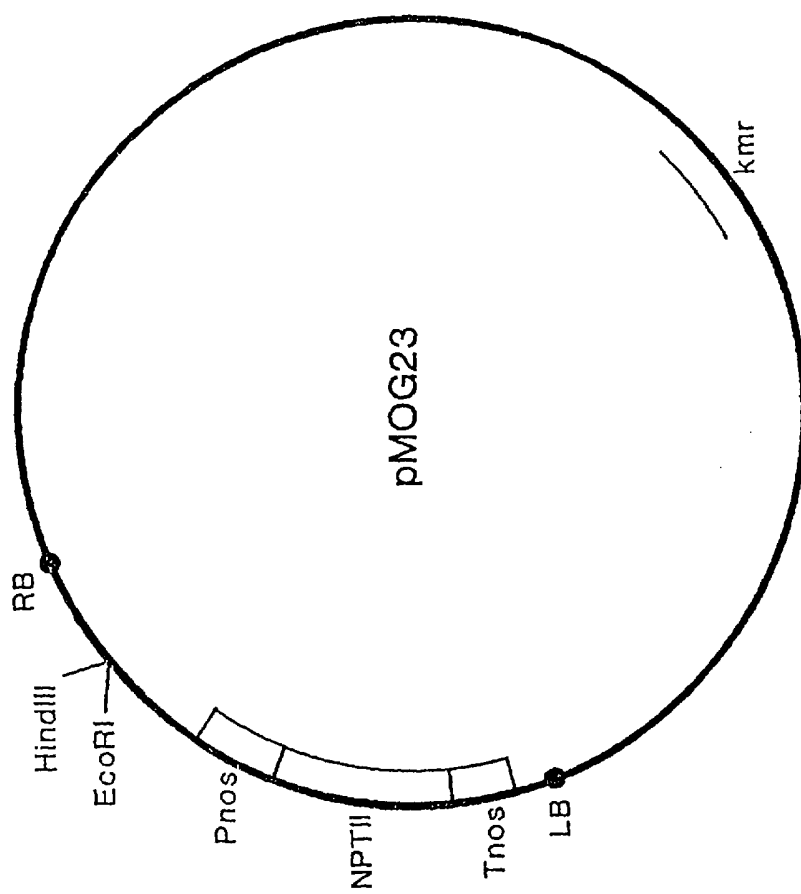
(ii) klónozzuk a HgaI/BamHI fragmenst egy hármas ligálással, a szintetikus F duplex oligonukleotiddal együtt a pMOG29 plazmidba az SphI/BamHI helyeknél, előállítva így a pMOG321 konstrukciót, és

(iii) behelyezzük a teljes pMOG321 konstrukciót egy EcoRI/HindIII fragmensként a pMOG23 bináris vektorba, miáltal egy kiméra alfa-amiláz gént tartalmazó pMOG227 konstrukcióhoz jutunk.

1. Á B R A



2. Á B R A



Polilinker szekvencia

Eco RI	Kpn I	Sma I	Bam HI	Xba I	Xba I	Hind III
<u>5' GGAATTCTGGTACCTCCCGGAGGATCCATCTAGAGCTCGAGTAAGCTTC 3'</u>						
					<u>Sac I</u>	

3. Á B R A (3/1 lap)

EcoRI

TATTACGTT CGGTCGGATA ACGGACGGGT TTTCAGTTCG GGTTCGGTTC GGATTTCGGG
TTCCGGGATTT ATATGGCCCT AGCCTAAATT CGAGTGTGAC CGTTAATCCG TTATACTACG
ATCTAATCAA AACATGTCTA GATCAAATTT GCAATCTTAT TGCATATTTT TTTGTCTAAC
AATATTACTA GAAATCTTTG TTTATTACCA ACATTAGTAA AACTATATCT TAACCAAAGT
TGCAGGAGCA GTTCGTTTCA AACGTAATTG CTATAGTGAT GTTATTGTAA ATTTGTTATA
CTGATCAAAT GTAAAGAATA ATACAAATTT ATATATATCT GACAAACAAA TCAGTATATA
TATACAAGAA ATATATATTT TGTCCTATTA CATATGCCA TCTCAAAGTT GATGTGTAAA
GACATGCAGT TCAATAAGCC ATGCAAATTG AGATGTGTCA AACTCCCTTC GTTAATATGT
GTTTCTTAC AATGTGAAGC CAAATTAAAT TTTCAGAAGA AGACATAAAG ATAGCAAATC
AAATGAAGTG TAGATTGTAC ATAGTCGACT CTATATACCT GGTTCCTTATC TCATTCAATT
TATCCTCAA AAAATTTATC AACATCTATA CAAATAAGTT CACTATAAAT AGCTTCATCT

*

AACTCAGCTG TAAGACCAGA AAAACCACAA CAACTAAGTA AAGAGAAAAT GGCTCGGCTC

NcoI

TCATCTCTTC TCTCTTTTTC CTTAGCACTT TTGACTTTTC TCCATGGCTC TACAGCTCAA
CAGTTTCCAA ACGAGTGTCA GCTAGACCAG CTCAATGCAC TGGAGCCGTC ACACGTACTT
AAGGCTGAGG CTGGTCGCAT CGAGGTGTGG GACCACCACG CTCCTCAGCT ACGTTGCTCT
GGTGCTCCT TTGTACGTTA CATCATCGAG TCTAAGGGTC TCTACTTGCC CTCTTCTTT
AGCACCCGGA GGCTCTCCTT CGTGGCTAAA GTACGTGAA TCTGATTTTG ATACTATATG

3. Á B R A (3/2 lap)

AGTATCGAGA TTCAAATTCG TGATCTTTAA GGTTCAGTCT TTTGAGAAAA GTGTTGTAGT
AAGTATATCA CTATACACGT GCTAAGGTTT TGATCAAATA CATTATAATA TTTTTTTTGT
TAATTTATAA CCTAAATATA TGGTCGATGT TCACAGAACT GCGCACTAAA TTTTTTTTTT
TTGGTTTGTT ACATTATAGG AGAAGGTCTT ATGGGGAGAG TGGTCCTGTG CGCCGAGACA
TTCCAGGACT CATCAGTGT TCAACCAAGC GGTGGTAGCC CCTTCGGAGA AGGTCAGGGC
CAAGGACAAC AAGGTCAGGG CCAAGGCCAC CAAGGTCAG GCCAAGGACA ACAGGGCCAA
CAAGGTCAGC AAGGACAACA GAGTCAAGGC CAGGGTTTCC GTGATATGCA CCAGAAAGTG
GAGCACATAA GGA CTGGGA CACCATCGCT ACACATCCCG GTGTAGCCCA ATGGTTCTAC
AACGACGGAA ACCAACCCT TGTATCGTT TCCGTCCTCG ATTTAGCCAG CCACCAGAAAT
CAGCTCGACC GCAACCCCAAG GGTATATAA TAAACAAAAA CCTCAAAAGC AATCAAGGGC
AAATCTCCTT TTTAGCATAT TTCTAAATTT ATATCACAAA AATAGCAATC AAAAACTAAA
ATGACCAAAA TCATACTTTT CTAAGTTTAT CCTTTGAAAA TTTTAAATTT TTTATTTTTC
AAATTTGAAT CTATACGCC AAACCTCAT TCTCAACCT AAACCATAAC CCTAATCTAA
ACCTTAAACC CTAAACCCCA AACCTTAAAC CCTAAACCTT AAATCCTAAA CCCCAGCCTT
AAACTCTAAA CCTAAACCC TAAAGTTTGT ACTTTTGATA AAACATTAAG TGCTATTTTG
TGACTTTGAC CTTGGTGCTA GTTTGAGAAC ATAAACTTGA TTTAGTGCTA TTTTGTGCTT
TTTCTCATCA TATAACTTCT TTTATAATTA CAGAAATATCA AAAATATGGT TTTCTGTTTT
ATCTGTAGCC ATTTTACTTA GCCGGAACA ACCACAAGG CCAAGTATGG ATAGAAGGAC
GCGAGCAACA GCCACAAAAG AACATCCTTA ATGGCTTCAC ACCAGAGGTT CTTCGCTAAAG
CTTTCAAGAT CGATGTTAGG ACAGCGCAAC AACTTCAGAA CCAGCAAGAC AACCGTGGAA
ACATTATCCG AGTCCAAGGC CCATTCAGTG TCATTAGGCC GCCTTTGAGG AGTCAGAGAC
CGCAGGAGGA AGTTAACGGT TTAGAAGAGA CCATATGCAG CGGAGGTGC ACCGATAACC

3. Á B R A (3/3 lap)

TCGATGACCC ATCTAATGCT GACGTATACA AGCCACAGCT CGGTACATC AGCACTCTGA
ACAGCTATGA TCTCCCCATC CTTGCTCTC TTCGCTCTC AGCCCTCCGT GGATCTATCC
GTCAAAACGC GATGGTGCTT CCACAGTGA ACGCAAACGC AAACGCGGTT CTCTACGTGA
CAGACGGGGA AGCCCATGTG CAGGTGTTA ACGACAACGG TGACAGAGTG TTCGACGGAC
AAGTCTCTCA AGACAGCTA CTTTCCATAC CACAAGGTTT CTCCGTGGTG AAACGCGCAA
CAAGCGAACA GTTCCGGTGG ATCGAGTTCA AGACAACACG AAACGCACAG ATCAACACAC
TTGCTGGACG AACCTCGGTC TTGAGAGGTT TACCATTAGA GGTCAATATCC AATGGGTACC
AAATCTCACT CGAAGAAGCA AGAAGGTTA AGTTCAACAC GATCGAGACC ACTTTGACGC

BglII

ACAGCAGTGG CCCAGCTAGC TACGGAGGGC CAAGGAAGGC TGATGCTTAA GAGCTTACCC
AGTGAACCTC TACTGTAAAA GGAAGTTAA TAGTAATAAA AAGAGTAATA ATAATGTACG
CAAATGTGAC TGGTTTGTG GAGGTTTGTG AATGTTACTC CTTTCTGAA TAAAATAACT
CTTTCTATC AAGTTTAGC TAGCTGGGCT AATCTATCAA CTTTCTTTT CGACTACGTC

HindIII

TACACATACG TATACGAGAT GCAGGCTTCT CCGAGGATAT AGTGACAGTA TCT

4. Á B R A (2/1 lap)

Oligonukleotid duplex A

5'GGGTTTATTTTAAATTTCTTCAAAATACTTCCACCATGGGTAAACGGATCCA 3'
3'CCCAAAATAAAATTAAGAAAGTTTATGAAGGTGGTACCCATTGCCCTAGGTTCCA 5'

NcoI BamHI HindIII

Oligonukleotid duplex B

5'CATGAAACTTCCTCAAAAGCTTCCCTTTTATGCCTTCCCTTGTGTTGGCCCAATACTTTGTAGCTGTTACGCATGCTCGAG 3'
3' TTTGAAGGAGTTTTCGAAGGGGAAATAACGGAAGGAAACAAACCCGGTTATGAAACATCGACAATGCGTACGAGCTCCTAG 5'

SphI XhoI BamHI

Oligonukleotid duplex C

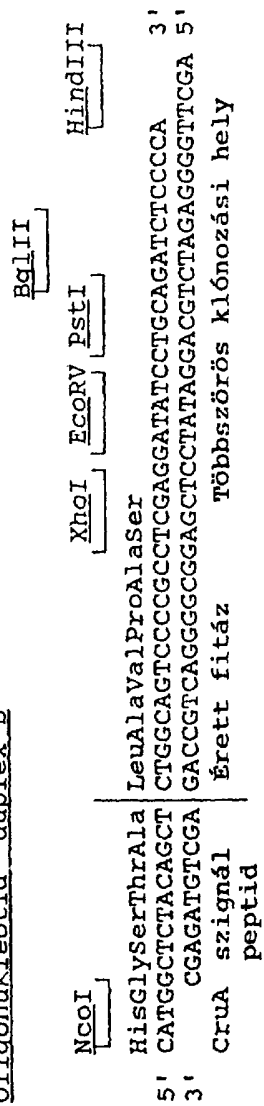
SphI XhoI PstI BamHI

5' CT CTGGCAGTCCCCGCCCTCGAGCCCCCTGCAG 3'
3' GTACGA GACCGTCAGGGCGGAGCTCGGGGACGTCCTAG 5'

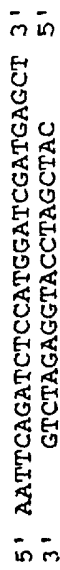
PROB12 érett fitáz
szignál
peptid

4. Á B R A (2/2 lap)

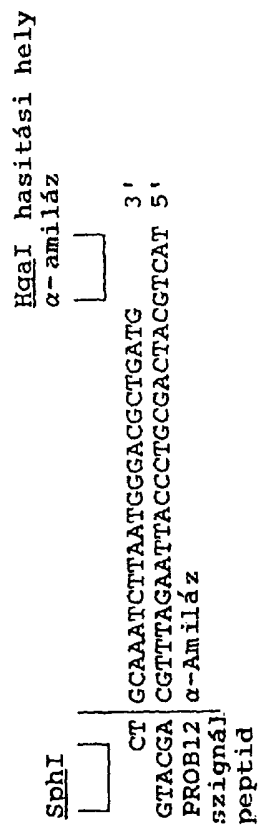
Oligonukleotid duplex D



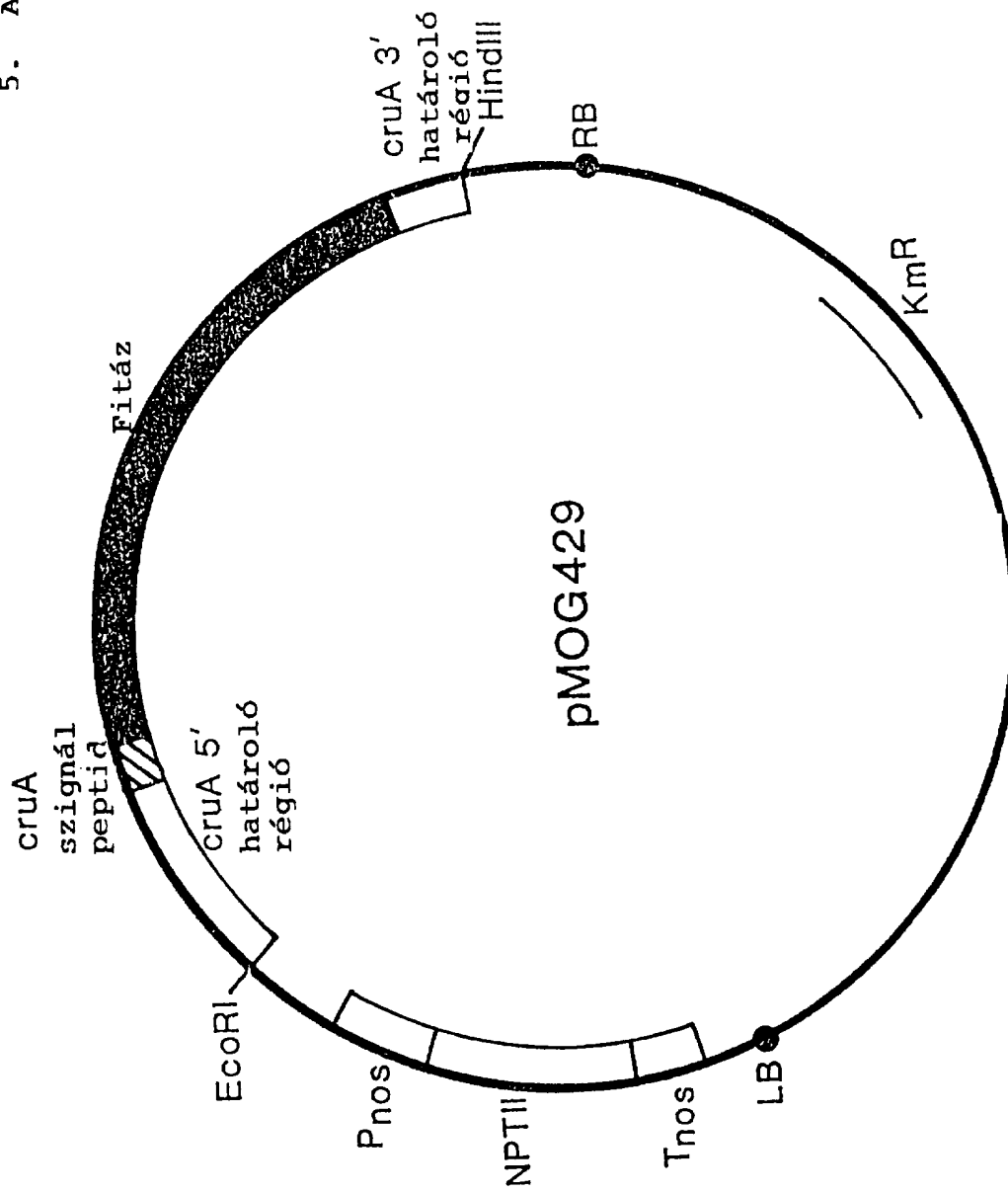
Oligonukleotid duplex E



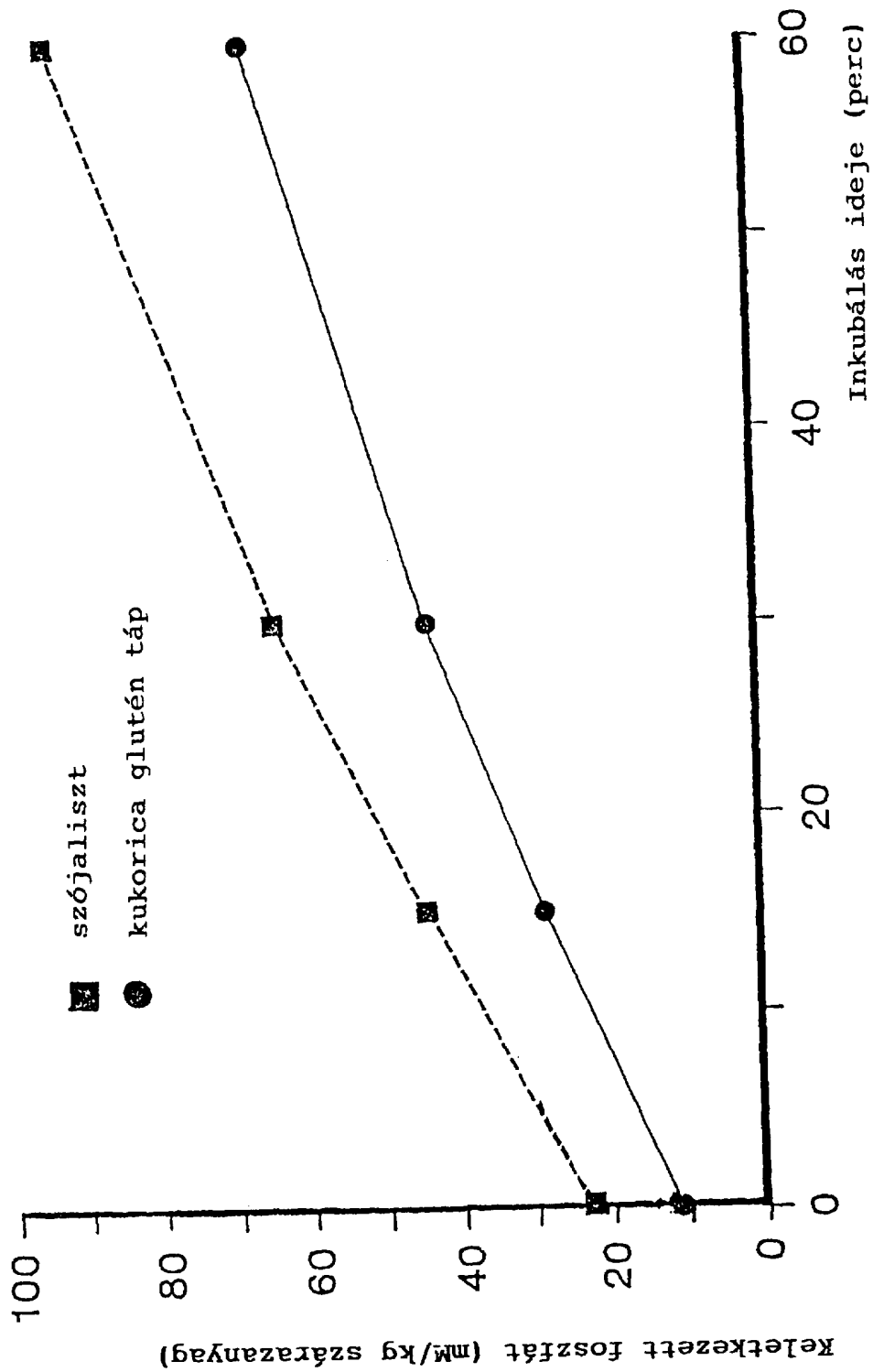
Oligonukleotid duplex F



5. Á B R A



6. Á B R A

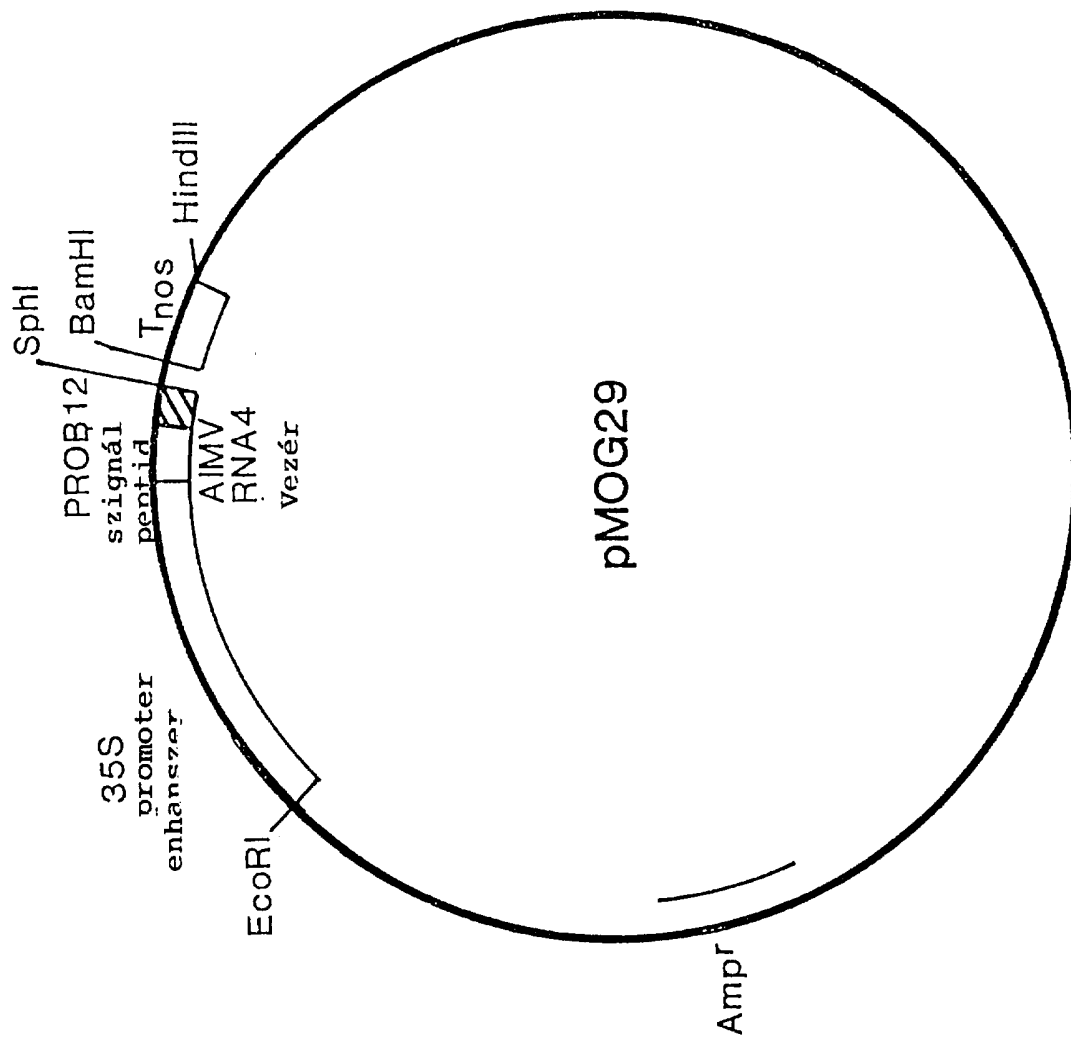


27

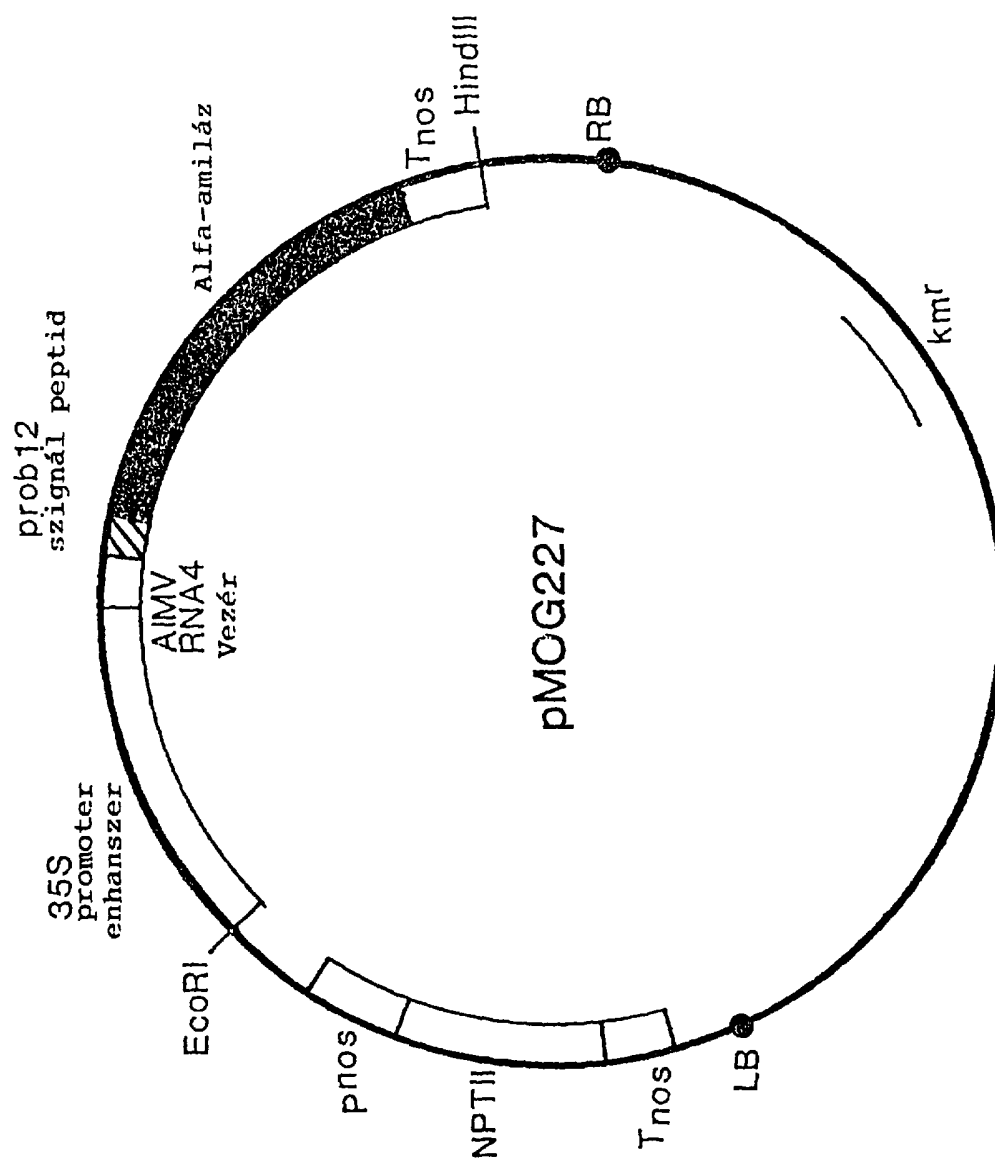
7. Á B R A (2/2 lap)

CGCGCTGGAA AACTATTTTGA ACAAACAATA TTTTAATCAT TCAGTGTGTTG ACGTGCCGCT
TCATTATCAG TTCCATGCTG CATCGACACA GGGAGGCGGC TATGATATGA GGAAATTGCT
GAACGGTACG GTCGTTTCCA AGCATCCGTT GAAATCGGTT ACATTTGTGCG ATAACCATGA
SalI
TACACAGCCG GGGCAATCGC TTGAGTCGAC TGTCCAAACA TGGTTTAAGC CGCTTGCTTA
CGCTTTTATT CTCACAAAGG AATCTGGATA CCTCAGGTT TTCTACGGG ATATGTACGG
GACGAAAGGA GACTCCCAGC GCGAAATTCC TGCCTTGAAA CACAAAATTG AACCGATCTT
AAAAGCGAGA AAACAGTATG CGTACGGAGC ACAGCATGAT TATTTCGACC ACCATGACAT
TGTCGGCTGG ACAAGGGAAG GCGACAGCTC GGTGCAAAAT TCAGGTTTGG CGGCATTAAAT
AACAGACGGA CCCGGTGGG CAAAGCGAAT GTATGTCGGC CGGCAAAACG CCGGTGAGAC
ATGGCATGAC ATTACCGGAA ACCGTTGCGA GCGGTTGTC ATCAATTGCG AAGGCTGGGG
AGAGTTTCAC GTAAACGGCG GGTGCGTTTC AATTATGTT CAAAGATAGA AGAGCAGAGA
BamHI
GGACGGATTT CCTGAAGGAA ATCCGTTTTT TTATTTTGCC CGTCTTATAA ATTTCTTTGA
TTACATTTTA TAATTAATTT TAACAAAAGTG TCATCAGCCC TCAGGAAGGA CTTGCTGACA
GTTTGAATCG CATAGGTAAG GCGGGGATGA AATGGCAACG TTATCTGATG TAGCAAAAGAA
BclI
AGCAAATGTG TCGAAAATGA CGGTATCGCG GGTGATCA

8. Á B R A



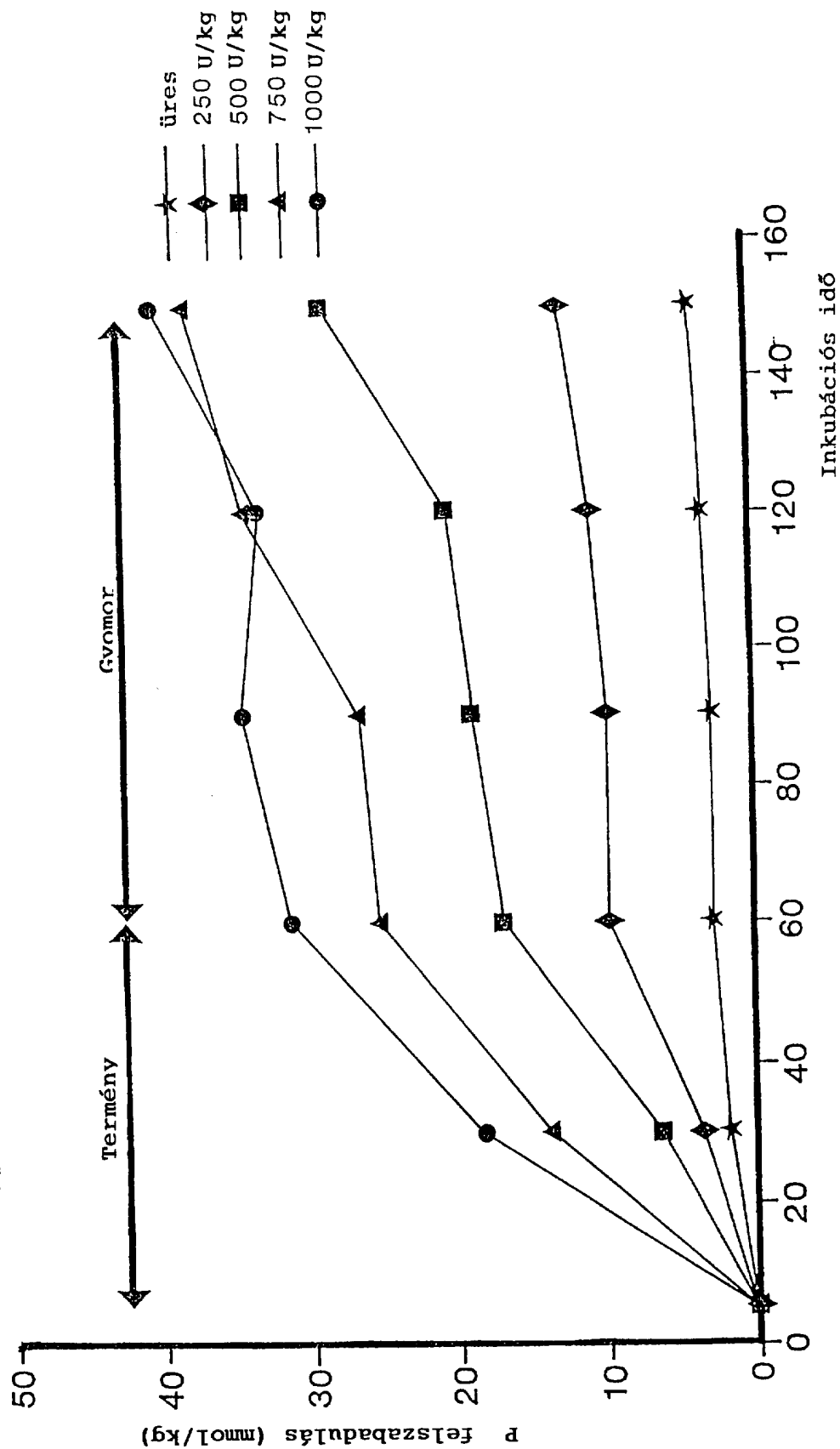
9. Á B R A



10. Á B R A

IN VITRO EMÉSZTHETŐSÉGI MODELL

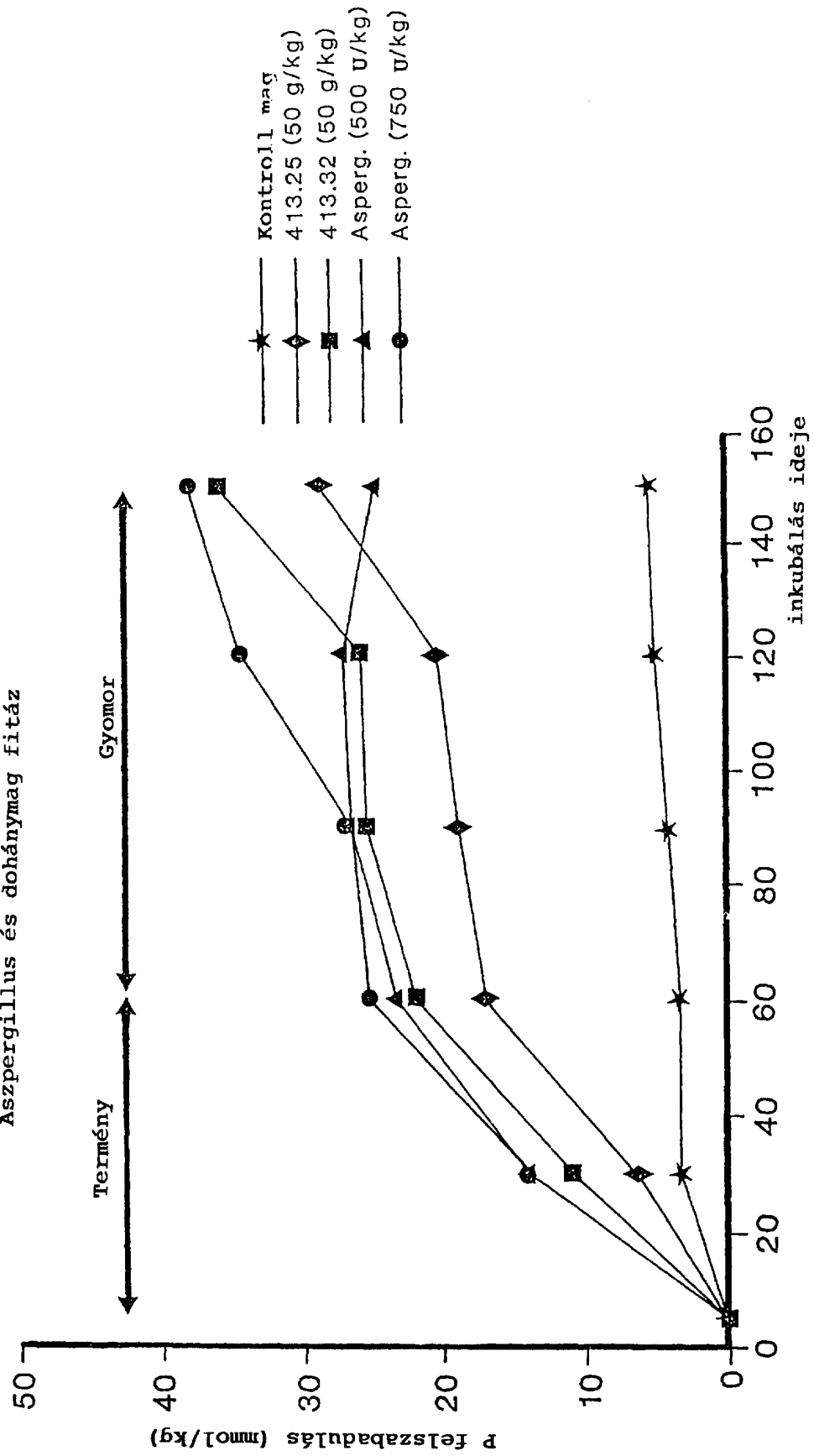
ASZPERGILLUSZ FITÁZ DÓZIS-VÁLASZ ÖSSZEFÜGGÉS



11. Á B R A

IN VITRO EMÉSZTHETŐSÉGI MODELL

Aszpergillus és dohánymag fitáz



12. Á B R A

