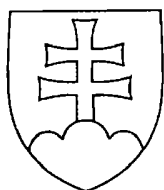


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA**

- (22) Dátum podania prihlášky: **8. 12. 2000**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **19992659**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **10. 12. 1999**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **FI**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **6. 11. 2002**
Vestník ÚPV SR č.: **11/2002**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **PCT/FI00/01081**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: **WO01/41559**

(11), (21) Číslo dokumentu:

825-2002

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :

**A01H 5/10,
C12N 15/82**

(71) Prihlasovateľ: **UNICROP LTD, Helsinki, FI;**

(72) Pôvodca: **Koivu Kimmo, Helsinki, FI;
Kuvshinov Viktor, Vantaa, FI;
Kanerva Anne, Helsinki, FI;
Pehu Eija, Washington, D.C., US;**

(74) Zástupca: **ROTT, RŮŽIČKA & GUTTMANN, v. o. s., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob konverzie zásobných rezerv semien dvojkličných rastlín na zmesi obsahujúcej jeden alebo viac génových produktov**

(57) Anotácia:
Je opísaný spôsob produkcie génových produktov zo zásobných rezerv drvených alebo nedrvených klíčiacych semien dvojkličných rastlín obsahujúcich expresívny systém, ktorý je iniciovaný alebo môže byť iniciovaný počas klíčenia. Produktom je zo semena pochádzajúca zmes obsahujúca jeden alebo viac výsledných génových produktov. Alternatívne sa získa výsledný produkt tak, že sa získaná zmes skontaktuje so substrátom obsahujúcim substanciu schopnú transformácie zo semena pochádzajúcej zmesi samotnej, v sušenej alebo nadväzujúcom spôsobom spracovanej forme.

Spôsob konverzie zásobných rezerv semien dvojklíčnych rastlín na zmesi obsahujúce jeden alebo viac génových produktov

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka spôsobu založeného na princípe zdroja a spotrebiča na konverziu rezerv uložených v semenách dvojklíčnych rastlín na zmesi obsahujúce jeden alebo viac génových produktov, o ktoré je záujem. Vynález tiež uvádza zmes pochádzajúcu z klíčiach semien, obsahujúcu najmenej jeden génový produkt v kotyledóne (prvom klíčnom liste), počítajúc do toho sadenicu, alebo v prostredí obklopujúcom klíčiace semeno alebo sadenicu.

Doterajší stav techniky

Metódy produkcie terapeuticky aktívnych cicavčích proteínov izoláciou a rafináciou z cicavčích zdrojov boli v súčasnej dobe, kvôli zvýšenému riziku kontaminácie, v širokej miere nahradené technológiou rekombinantnej DNA (génovým inžinierstvom) poskytujúcou nové možnosti na výrobu veľkých množstiev priemyselne žiaducich cicavčích proteínov. Génové inžinierstvo poskytuje široký výber hostiteľských systémov a systémov na expresiu. Ak sú žiadanými cieľovými proteínmi proteíny cicavčie, sú s cieľom získania glykozylovaných foriem žiadaných proteínov preferované eukaryotické hostiteľské systémy.

Najefektívnejší hostiteľský systém na veľkoobjemovú a nízkonákladovú výrobu glykozylovaných proteínov predstavujú huby. I keď huby boli úspešné pri produkcii vysokých množstiev svojich natívnych proteínov, neboli rovnako tak úspešné v exprimovaní heterológnych proteínov, ako sú terapeutické cicavčie proteíny.

Huby sú v súčasnej dobe používané hlavne na veľkokapacitnú produkciu homologických priemyselných enzýmov, zatiaľ čo na produkciu glykozylovaných heterológnych proteínov sa ohnisko výskumného záujmu zameralo na vy-

hľadanie alternatívnych systémov expresie. Pretože sa glykozylačné spôsoby a postupy skladby v rastlinných hostiteľských systémoch podobajú tým v cicavčích systémoch, sú z dostupných systémov rastlinné hostiteľské expresívne systémy z hľadiska nákladov zďaleka najefektívnejšie. Hlavný záujem bol zameraný na produkciu farmaceuticky a priemyselne dôležitých enzýmov. Uvedená môže byť produkcia interferónu, enkefalínov, epidermálneho rastového faktora, albumínu ľudského séra v tabaku a/alebo zemiakoch. Hladiny expresie u transgénnych rastlín boli pomerne nízke.

Cudzie gény sú v rastlinách obvykle exprimované vo vývojových orgánoch rastlín pod silnými tkanivovo špecifickými promótormi. Typickými príkladmi sú promótor zásobných proteínov semien alebo pre hľuzy špecifický patatínový promótor v zemiakových hľuzách. Alternatívne sú používané bunčné alebo orgánové kultúry alebo kultúry z rias, rovnako ako aj sofistikovanejšie systémy, vrátane systémov založených na rastlinných vírusoch s požadovaným génom zapojeným vo vnútri genómu vírusu a exprimovaným súčasne s proteínmi vírusu. Najpokročilejšie systémy sa spoliehajú na indukovateľnú expresiu a sekréciu rekombinantného proteínu do média.

Patenty US 5 693 506 a US 5 994 628 uvádzajú produkčný systém na produkciu cudzích proteínov v klíčiach semenách jednoklíčných rastlín. Rekombinantné proteíny sú exprimované pod silným amylázovým promótorom v bunčnej kultúre alebo v klíčiacom semene a proteín je vylučovaný do živného média alebo extrahovaný zo sladu. V semene jednoklíčných rastlín pozostávajú zásobné rezervy prevažne zo škrobovitého endospermu. Proteínové zásoby u jednoklíčných rastlín sa, v porovnaní s tými v semenách dvojklíčných rastlín, vyskytujú v malom množstve. Okrem toho, aj keď je expresia amylázy v špecifických bunkách vysoká, exprimuje amylázu v semene len malý počet buniek. Tieto bunky sú obmedzené na skutelum zárodka a aleurónovú vrstvu endospermu. Existuje veľký dopyt po poskytnutí účinnejších systémov, ktoré by využili zásobné rezervy proteínov a olejov v semenách dvojklíčných rastlín. Patenty US 5 543 576 a US 5 714 474 opisujú metódu, pri ktorej sú transgénne semena bez predklíčenia a v mletej forme pridávané do živinových zmesí ako dodatočné zdroje enzýmov.

Patent US 5 670 349 opisuje použitie poranením vyvolateľných HMGR/HMG2 promótorov na expresiu rekombinantných proteínov v čerstvých tabakových listoch po ich zbere z poľa. Poranenie čerstvého alebo skladovaného rastlinného materiálu narezaním alebo drvením vyvoláva rýchly vzrast expresie. Avšak obsah proteínu v tabakovom liste je malý v porovnaní s tým, ktorý možno získať zo semena dvojklíčnych rastlín. Okrem toho, skladovateľnosť čerstvých listov nie je so skladovateľnosťou suchých semien porovnateľná čo sa týka doby, priestoru a/alebo nákladov na skladovanie. Používanie čerstvého rastlinného materiálu, ako sú listy zobrať z poľa, je tiež hlavným zdrojom mikrobiálnej kontaminácie, ktorá je vo fermentačnej technológii vážnym problémom.

Patentové prihlášky WO 94/11519 a WO 97/32986 zverejňujú metódy a zariadenia na produkciu degradačných a konverzných produktov v rastlinách pomocou procesu sladovania. Pri týchto metódach sa predpokladá, že enzýmy sú aktívne v glyoxyzómov, ktoré katalyzujú rozštiepenie mastných kyselín na acetylkoenzým A. Tento acetyl-CoA, ktorý je normálne využívaný na tvorbu organických kyselín, ktoré môžu byť exportované z glyoxyzómov a použité v iných metabolických pochodoch ako je dýchanie a syntéza sacharózy, by mal byť nahradený génom kódujúcim enzýmy na ceste vedúcej k polyhydroxyalkanoátom vhodným na produkciu biodegradabilných termoplastov.

I keď postupy sladovania sú známe a boli použité najmä na prípravu jednoklíčnych rastlín, je treba poznamenať, že tieto pochody sú obmedzené na spracovávanie škrobu. Metódy uvedené v patentoch WO 94/11519 a WO 97/32986, i keď navrhujú využitie zásobných rezerv u dvojklíčnych rastlín, sú obmedzené na aplikáciu enzýmov a ciest, ktoré riadia produkciu sacharózy a energie, a ako využiť tieto produkty z respiračných pochodov pre spätnú syntézu.

I keď je známe sladovanie a metódy na využitie respiračných pochodov v rastlinách na produkciu polyhydroxyalkanoátov, využitie zásobných rezerv u dvojklíčnych rastlín na produkciu proteínových produktov, ako štrukturálnych proteínov a enzýmov, vyriešené nebolo.

Je potrebné konštatovať, že po proteínových produktoch existuje veľký dopyt a vzhľadom na to je hlavnou úlohou predloženého vynálezu riešiť problém konverzie zásobných rezerv uložených v rastlinách na rôzne proteínové produkty, ktoré môžu byť ďalej použité na produkciu požadovaných produktov.

Hlavnou úlohou predloženého vynálezu je poskytnúť nový, uskutočniteľnejší, efektívnejší, pre životné prostredie priaznivý postup a produkčný systém na produkciu génových produktov, špeciálne proteínových génových produktov, v kotyledónoch transgénnych dvojklíčnych semien. Inou výhodou predloženého vynálezu je, že poskytuje produkčný systém na uvážené využitie, pri ktorom génový produkt môže byť produkovaný v definovaných podmienkach a nie na poli. To umožňuje uskutočňovať predkladaný proces v podmienkach takmer bez kontaminácie.

Podstata vynálezu

Ciele predkladaného vynálezu sú dosahované využitím regulačných sekvencií prechodných proteínov, hromadiacich sa počas iniciácie klíčenia, na produkciu žiadaných génových produktov.

Charakteristické znaky predkladaného vynálezu sú vyložené v patentových nárokoch.

Podrobný opis vynálezu

Definície

Väčšina termínov použitých v predkladanom vynáleze má ten istý význam ako v odboroch génového inžinierstva, molekulárnej biológie a botaniky, najmä v oblastiach vzťahujúcich sa na produkciu transgénnych rastlín a génových produktov. Niektoré termíny sú však použité trochu odlišným spôsobom a sú podrobnejšie vysvetlené nižšie.

Termín "semenné rastliny" znamená *Spermatophyta*, rastliny najvyššieho vývojového stupňa, charakterizované komplexnými štruktúrami vrátane úplne vyvinutých orgánov ako koreňov, stoniek, listov, kvetov a vaskulárneho systému. Semenné rastliny sa delia na dve triedy, krytosemenné (*Angiospermae*) a nahosemenné (*Gymnospermae*). Krytosemenné sú ďalej delené na podtriedy, t.j. jednoklíčne a dvojklíčne. Embryo zrelého semena jednoklíčných rastlín obsahuje len jeden kotyledón, ktorý je redukovaný na absorptívny štítok (*scutellum*). U dvojklíčnych rastlín má embryo dva kotyledóny, ktoré slúžia ako zásobné orgány. Asimiláty, potrebné na uloženie zásob v kotyledónoch dvojklíčnych rastlín, sú z materskej rastliny vaskulárnym systémom premiestňované do šupky semena a nakoniec do kotyledónu. Šupka semena je materským tkanivom a nie sú tu symplastické spojenia na embryo. Asimiláty prechádzajú apoplazmickým priestorom a potom sú zachytené embriom, symplasticky redistribuované a využité na syntézu rezerv.

Termín "dvojklíčne semeno" znamená semeno, ktoré možno získať z dvojklíčnych rastlín, a ktoré obsahuje v kotyledónoch mnohostrannú zásobnú rezervu počítajúc do toho proteíny, lipidy a sacharidy, na rozdiel od zásobných rezerv semien jednoklíčných rastlín, ktoré sú tvorené hlavne zo sacharidov a len malých množstiev ďalších zlúčenín. V predkladanom vynáleze je "dvojklíčnym semenom" mienené kompletne semeno alebo fragment alebo časť semena, ktoré možno získať preddrvením semena najlepšie v suchom stave. Treba poznamenať, že predložený vynález sa týka dvojklíčnych rastlín a na dosiahnutie cieľov predloženého vynálezu nemôžu byť použité rastliny jednoklíčne.

Najvhodnejšie rody rastlín, ktoré môžu byť aplikované na produkciu požadovaných génových produktov podľa postupu predkladaného vynálezu, zahŕňujú, ale nie sú obmedzené na dvojklíčne rastliny s vysokým obsahom proteínu alebo oleja v semenách. Typickými príkladmi sú nasledujúce rody: *Brassicaceae*, *Fabaceae* a *Polygonaceae*. Rod *Brassicaceae* zahŕňa nasledujúce druhy: *Brassica napus*, *Brassica campestris*, *Camelina sativa*, *Sinapis alba*, rod *Fabaceae* zahŕňa *Lupinus angustifolius*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Vicia faba*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Vigna mungo* a *Medicago sativa*. Rod *Po-*

lygonaceae zahrnuje druh *Polygonum*. Vzhľadom na vysoký obsah oleja v semenách je potenciálne užitočná tiež slnečnica, *Helianthus annuus*.

Termínom "princíp zdroja a spotrebiča" je mienený produkčný systém alebo produkčný celok, ktorý môže byť rozdelený na dve odlišné štádiá, akumulačné štádium, v ktorom sa v semene ukladajú rezervy proteínu, sacharidu a lipidu, a mobilizačné/produkčné štádium, v ktorom sú akumulované rezervy, mobilizované normálne pre iniciáciu rastu rastliny, namiesto toho mobilizované alebo využívané na produkciu jedného alebo viacerých cudzích génových produktov, o ktoré je záujem, spustením expresívneho systému. Akumulačné štádium zahrnuje kultiváciu transgénnych rastlín v podstate bez expresie génových produktov do terénu, zatiaľ čo produkcia génových produktov je obmedzená na klíčenie v definovaných podmienkach. Toto sa dá dosiahnuť špecifickou expresívneho systému opísanou detailnejšie v opise ďalej.

Termínom "okolité prostredie" je mienený vodný roztok pufru buď v kvapalnej, polotuhej alebo tuhej forme, ktorý obsahuje substancie schopné iniciovať, zvyšovať, oneskorovať alebo predlžovať najpriaznivejšie štádium klíčenia. "Okolité prostredie" môže obsahovať zavádzanie klíčenia, faktory regulujúce zvyšovanie určitých pochodov a/alebo faktory regulujúce obmedzovanie iných určitých pochodov, práve tak ako externé živiny. "Okolitým prostredím" môže byť tiež vlhký priestor alebo miestnosť.

Termín "substrát" znamená tuhú, polotuhú alebo kvapalnú kompozíciu alebo médium, ktoré obsahuje najmenej jednu zlúčeninu alebo substanciu, ktorá môže byť pri použití zmesi podľa predloženého vynálezu, obsahujúcej ako katalyzátor jeden alebo viac génových produktov o ktoré je záujem, transformovaná na inú zlúčeninu alebo substanciu s viac žiaducimi vlastnosťami.

Termín "zo semien pochádzajúca zmes" znamená surovú zmes pripravenú spôsobom podľa predkladaného vynálezu, ktorú možno získať z klíčiach dvojklíčnych semien obsahujúcich jeden alebo viac *de novo* syntetizovaných génových produktov, exprimovaných v kotyledóne naklíčeného semena dvojklíčnej rastliny vrátane sadenice alebo vylúčených do prostredia obklopujúceho klíčiace semeno alebo sadenicu. "Zo semien pochádzajúca zmes" môže byť po-

užitá ako taká, uvedeným do styku so substrátom. Zo semien pochádzajúca zmes môže byť sušená a/alebo ošetrovaná použiteľnými metódami nadväzujúceho postupu, práve tak ako izolovaná a/alebo rafinovaná pred použitím. Alternatívne je substrát činidlom obsahujúcim jednu alebo viac zlúčenín schopných modifikovať jeden alebo viac génových produktov v zmesi. Aby sa získal stabilný produkt, môžu byť pridávané napríklad substituenty alebo môžu byť modifikované skladbové časti génového produktu alebo odstránené či pridané fragmenty alebo časti. "Zo semien pochádzajúca zmes" môže byť tiež formulovaná, t.j. vybavená vhodnými aditívami ako sú činidlá zlepšujúce granuláciu, plnivá, lubrikanty, atď. Naklíčená, zo semien pochádzajúca zmes podľa predkladaného vynálezu, môže byť tiež pridávaná do krmiva pre zvieratá na zlepšenie vlastností krmiva podporujúcich trávenie.

Termínom "v podstate sterilný produkčný systém zdroja a spotrebiča" sa rozumie, že semená dvojkľíčných rastlín môžu byť povrchovo sterilizované metódami ako je ožarovanie alebo chemická sterilizácia. Klíčenie môže byť uskutočňované v alebo na vopred sterilizovanom okolitom médiu s použitím spôsobov aplikovaných pri aseptických pracovných metódach a/alebo pri práci v sterilných alebo superčistých podmienkach. Skutočnosť, že celá produkcia môže byť uskutočňovaná v sterilných podmienkach znamená, že môžu byť vylúčené hlavné príčiny zmarenia alebo nevyklíčenia semien, t.j. fungálna alebo bakteriálna kontaminácia semien. Navyše ďalej je konečný produkt taktiež v podstate prostý kontaminácie a nenáchylný k degradácii kontaminantami s proteolytickými aktivitami. Produkčný systém je teda tiež obzvlášť vhodný na produkciu farmaceutických produktov, ktorý vyžadujú vysoké hygienické štandardy.

Termínom "iniciácia klíčenia transgénnych dvojkľíčných semien" sa rozumie zaistenie podmienok priaznivých pre klíčenie. To prípadne zahŕňa skladovanie, sušenie, sterilizáciu, pridávanie vody, doplňovanie semien regulačnými faktormi indukujúcimi rovnako tak zosilňovanie a/alebo zoslabovanie, ako aj vonkajšiu výživu. Doplnky zahŕňajú prostriedky ako fyzikálne, tak aj chemické. Vonkajšia výživa obsahuje napríklad N- a/alebo C-zdroje, vitamíny, minerály, stopové prvky, atď. Rastové faktory, klíčenie spúšťajúce faktory, za-

vádzacie činidlá, faktory schopné počas syntézy *de novo* regulovať niektoré procesy k zosilneniu a iné potlačovať, zahŕňujú napríklad rastlinné hormóny ako auxín a cytokinín. Fyzikálne prostriedky predstavujú napríklad svetelné záblesky alebo osvetľovanie počas dlhšej doby, práve tak ako sterilizáciu a/alebo zahrievanie.

Termín "expresívny systém" znamená konštrukt DNA, obsahujúci jednu alebo viac sekvencií DNA kódujúcich jeden alebo viac génových produktov o ktoré je záujem, operatívne spojené so sekvenciami regulujúcimi expresiu ako sú zosilňovače transkripcie, promótor a/alebo terminátory. Expresívny systém je najvhodnejšie taký, že je alebo môže byť navodený počas klíčenia semena, ale je v podstate nečinný alebo môže byť umlčaný, keď sa dvojklíčna rastlina množí a kultivuje v poľných podmienkach. Expresiu regulujúce sekvencie obsahujú výhodne promótor, ktorý môže byť nazvaný "*camera obscura*" promótor, t.j. promótor, ktorý je spustený alebo aktivovaný počas klíčenia, keď je semeno v podmienkach bez svetla v temnej miestnosti. To nevylučuje použitie iluminácie alebo svetla. Oproti tomu podrobenie produkčného systému s úbytkom zdroja záblesku svetla, môže zvýšiť produkciu žiadaného génového produktu vyvolaním a zvýšením aktivity špecifického promótora.

Expresívne systémy využívajú výhody takých expresiu regulujúcich sekvencií, ktoré sú aktívne najmä v *de novo* syntéze prechodných proteínov, ktoré sa hromadia v kotyledóne počas iniciácie klíčenia.

Také indukovateľné expresívne systémy obsahujú indukovateľné regulačné sekvencie volené z regulačných sekvencií génov kódujúcich prechodné proteíny, ktoré sú *de novo* syntetizované počas iniciácie klíčenia a akumulácie v kotyledónoch a endosperme rastliny.

Uvedené expresívne systémy môžu byť pripravené vybraním vhodných regulačných sekvencií. Spôsob selekcie sa skladá z týchto krokov

- a) izolácia celkovej RNA z kotyledónov a/alebo listov dvojklíčnych rastlín;
- b) príprava cDNA z tejto izolovanej RNA amplifikáciou tejto RNA s jedným pre rastlinu špecifickým primérom a primérom špecifickým pre proteín,

ktorý je *de novo* syntetizovaný počas iniciácie klíčenia a akumulácie v kotyledónoch a endosperme rastliny;

- c) zhromaždenie a naniesenie cDNA obsahujúcich klonov na platne;
- d) porovnanie výsledkov s klonmi získanými z listu pochádzajúcej RNA a
- e) znovuzískanie klonov obsahujúcich cDNA vykazujúcu zvýšenú aktivitu v klíčiach dvojklíčnych semenách.

Termín "génový produkt" v predkladanom vynáleze značí proteíny, polypeptidy, vrátane aj štrukturálnych proteínov a/alebo enzýmov. "Génový produkt" je obvykle peptid obsahujúci najmenej dve aminokyseliny spojené spolu peptidovou väzbou. Peptidy obsahujúce 2 až 10 aminokyselín sa nazývajú oligopeptidy, zatiaľ čo peptidy obsahujúce viac než 10 aminokyselín sa nazývajú polypeptidy. Polypeptidom môže byť reťazec polyaminokyselín ako polylyzínový reťazec pozostávajúci len z molekúl lyzínu, ale môže to byť i proteín, proteínový komplex alebo časť alebo fragment proteínu.

Ako bolo uvedené v predchádzajúcom odstavci, termín "génový produkt" môže znamenať tiež produkty založené na nukleotidoch, ako mRNA. V termíne sú obsiahnuté tiež iné žiadané biochemikálie, zlúčeniny alebo substancie, ktoré sa dajú získať napríklad biotransformačnými procesmi, v ktorých jeden alebo viac génových produktov prítomných v zmesiach pochádzajúcich zo semien podľa predkladaného vynálezu pôsobi ako katalyzátory, ak sú uvedené do styku so substrátom obsahujúcim zlúčeninu alebo substanciu, ktorá môže byť transformovaná na požadovaný produkt alebo transformuje génový produkt požadovaným spôsobom.

"Deriváty génových produktov" možno alternatívne získať transformačnými procesmi, v ktorých je jeden alebo viac originálnych "génových produktov" podľa predkladaného vynálezu modifikovaných tak, že činidlu prítomnému v substráte umožňujú ich modifikovať. Génové produkty možno urobiť stabilnejšími alebo aktívnejšími zmenením ich sekundárnych a/alebo terciárnych štruktúr, napr. znovuzložením alebo preskladaním reťazca aminokyselín, alebo odoberaním alebo pridávaním komplexujúcich fragmentov, alebo pridaním

štruktúr alebo substituentov k týmto génovým produktom. Také "deriváty génových produktov" sú v termíne "génový produkt" podľa predkladaného vynálezu obsiahnuté taktiež. "Génové produkty" produkované podľa predkladaného vynálezu sú obvykle heterológnyimi cudzími proteínmi. To znamená, že "génový produkt" nie je produkovaný divokým typom rastliny. Inými slovami, nie je pre hostiteľskú rastlinu natívny. Natívne semenné produkty však môžu byť produkované s využitím postupu podľa predkladaného vynálezu. Možno ich využívať zvlášť na zvýšenie produkcie určitých, farmaceuticky užitočných, natívnych homologických produktov pochádzajúcich z rastlín.

Termín "získanie génového produktu exprimovaného kľúčiacimi semenami transgénnych dvojkľúčnych rastlín pomocou alebo bez následného spracovania" znamená, že kotyledóny vrátane semenáčikov môžu byť ako také získavané ich oddelením z okolitého kvapalného média pomocou alebo bez akéhokoľvek ďalšieho spracovania. Alternatívne sa okolité médium získava ako také. Skladovateľnosť "zmesi získanej zo semien" môže byť zlepšená sušením, extrakciou, filtráciou, drvením, atď. Mnohé z týchto spôsobov sú súčasne používané na zastavenie klíčenia. Zahrievanie, sušenie, drvenie, separovanie, extrahovanie, lisovanie a filtrácia sa obvykle používajú na zastavenie klíčenia pred poklesom intenzity syntézy *de novo* a/alebo keď požadované génové produkty klesajú. Zastavovanie je dôležité, pretože keď sa klíčenie nechá príliš dlho pokračovať, dochádza k zneužitiu *de novo* syntetizovaných, žiadaných proteínov na produkciu iných substancií, ktoré rodiaca sa rastlina potrebuje.

Všeobecný opis vynálezu

Zásobné rezervy v kľúčiacich semenách dvojkľúčnych rastlín, ktoré predstavujú uvoľnené aminokyseliny a iné biochemické substancie, obsahujú obnoviteľnú entitu zdroja suroviny, zatiaľ čo expresia požadovaného transgénu reguláciou transkripcie, fungujúca v kotyledóne počas klíčenia a nasledujúceho rastu sadenice, tvorí entitu produkčnú (spotrebič). Predkladaný vynález sa teda predovšetkým týka produkčného systému obsahujúceho dva celky, zdroj a spotrebič, t.j. dve oddelené štádiá, štádium akumulácie suroviny a štádium produk-

cie, v ktorom je zdroj surového materiálu využívaný na *de novo* syntézu génových produktov a ich derivátov alebo produktov modifikovaných génovým produktom zo zdroja suroviny získaného v prvom štádiu produkčného systému.

Cieľom predkladaného vynálezu je vyvinúť nový postup spočívajúci na produkčnom systéme zdroja a spotrebiča na produkovanie génových produktov v dvojklíčnych semenách. Produkcia obsahuje dve oddelené štádiá. Prvé štádium využíva najrôznejšie obnoviteľné zdroje suroviny, ako proteíny a oleje, ktoré sa hromadia ako zásobné rezervy u dvojklíčnych rastlín počas kultivácie, a ktoré môžu byť prípadne zberané vo forme semien. Druhé štádium obsahuje mobilizáciu rezerv uložených v klíčiacej transgénnej rastline na produkciu jedného alebo viac génových produktov, *de novo* syntézou požadovaného génového produktu s pomocou alebo bez pridávania doplnkov, ako nutričných faktorov a poskytnutie fyzikálnych a/alebo chemických prostriedkov, rovnako ako genetického inžinierstva, na vyvolanie klíčenia a regulácie zosilnenia a/alebo zoslabenia *de novo* syntézy, počítajúc do toho transkripciu, expresiu a/alebo sekreciu.

Predkladaný vynález vo svojej prvej fáze využíva mnohostranné zásobné rezervy obsahujúce proteíny, oleje a/alebo sacharidy prítomné vo dvojklíčnych rastlinách, ale chýbajúce u jednoklíčnych rastlín, v ktorých zásobné rezervy z hlavnej časti zahŕňujú dve príbuzné formy škrobu, amylózu a amylopektín. U jednoklíčnych rastlín je škrob počas klíčenia mobilizovaný amylázami a nasledujúcim rastom rodiacej sa sadenice. Vznikajúca sacharóza je využívaná ako zdroj energie a uhlíkových zlúčenín, avšak surovina pre *de novo* syntézu, zvlášť proteínov, sa vyskytuje oveľa vzácnejšie než u dvojklíčnych rastlín, čo spôsobuje, že naklíčené semená dvojklíčnych rastlín sú pre produkčný systém zdroja a spotrebiča neporovnateľne lepšie.

V predkladanom vynáleze sú transgénne semená dvojklíčnych rastlín zberané z poľa, transportované a uskladnené, ako je obvyklé. Životnosť uskladnených semien môže byť uchovaná počas dlhej doby, obvykle až niekoľko rokov. Hlavnými faktormi určujúcimi životnosť semien počas skladovania je teplota a obsah vlhkosti v semene. Semená sú obvykle skladované pri teplotách 0 až 5°C. Normálny obsah vlhkosti skladovaných semien je 4 až 10 %. Ak je obsah vlh-

kosti menší než 20 %, semeno dýcha a vyvíja sa teplo. Ak sú zlé podmienky ventilácie, môže vyvinuté teplo semeno zničiť. Ak je obsah vlhkosti nad 20 %, môže dôjsť ku skazeniu semena v dôsledku mikrobiálneho rastu.

Vysušanie pri dozrievaní je normálnym javom pri vývoji semena, pri ktorom semeno prechádza do metabolicky pokojového stavu. Avšak semená mnohých druhov môžu klíčiť bez vysychania. Semená rajčín môžu byť klíčené, keď sú vybraté z dozrievajúceho plodu a umiestnené do vody. U niektorých iných druhov, vrátane *Brassica campestris*, klesá pri vysychaní semien prudko obsah škrobu a vzrastá koncentrácia niektorých sacharidov a oligosacharidov. U vysychajúcich semien sú tiež silne exprimované určité hydrofilné proteíny. Tie majú schopnosť upútať vodu a predpokladá sa, že hrajú významnú úlohu v ochrane proti škodlivým účinkom pri vysychaní. Zrelé suché semená si udržiavajú schopnosť klíčenia a môžu byť skladované počas doby dní až mnohých rokov. Hrubý, neformulovaný surový materiál semien dvojkličných rastlín môže byť stabilne skladovaný až niekoľko rokov.

U dvojkličných semien sú hlavnou zásobnou formou lipidov triacylglyceroly, ukladané v subcelulárnych organelách ako olejovité telieska. Obsah oleja v semenách môže dosahovať výšku až 64 % v ricínovom zrne alebo 48 % v semene repky. Zásobný olej je syntetizovaný zo sacharózy prenikajúcej do vyvíjajúceho sa semena. V cytosóle je sacharóza konvertovaná na fosfát hexózy, ktorý je premiestňovaný do plastidov alebo konvertovaný na glycerol-3-fosfát (nosiť glycerolu). Vychádzajúc z fosfátu hexózy sú v plastidoch syntetizované mastné kyseliny, jablčnan a octan. V endoplazmatickom retikule (ER) sú mastné kyseliny a nositeľ glycerolu esterifikované za vzniku triacylglycerolov.

U dvojkličných rastlín sú glutamín a asparagín hlavnými aminokyselinami transportovanými floémom. V šupke semien je pred premiestnením do kotyledónov časť glutamínu a asparagínu premenená na iné aminokyseliny. V kotyledónoch sú pre syntézu ukladaných proteínov využívané aminokyseliny, z ktorých sú skladané proteínové celky. V ranom vývoji semena obsahuje kotyledón jednu alebo dve vakuoly, ktoré sa neskôr zaplňajú ukladaným proteínom a postupne fragmentujú, aby vytvorili odlišné a oddelené, menšie proteínové celky. Semeno dvojkličnej rastliny obsahuje obvykle dva alebo viac rôznych ulo-

žených proteínov. Napríklad *Brassica campestris* má celkový obsah proteínu 24 %, obsahujúci napríklad 2S albumín, napín, 11S globulín a kruciferín. Z celkového obsahu proteínu v semene predstavuje napín 20 % a kruciferín 60 %. V predkladanom vynáleze je možné využívať gény kódujúce uvedené proteíny.

Ukladané proteíny sú obvykle kódované multigénnymi rodinami. Všeobecným rysom pre luminálne proteíny endoplazmatického retikula eukaryontov je zachovávaný karboxy-terminálny tetrapeptid KDEL, ktorý slúži ako ER-retenčný signál a vždy sa nachádza na najzadnejšom karboxy-konci. Neexistuje dôkaz o tom, že by bolo nevyhnutné zachovanie viac než štyroch koncových aminokyselín [Pelham H. R. B., *TIBS* 15, 483-486 (1990)], hoci bolo prehlásené, že kompozície kyselinových zvyškov medzi 20 aminokyselinami môže mať istý význam pre účinnú retenciu [Wandelt C. I. a spol., *Plant J.* 2, 181-192 (1992)]. Navrhovaný mechanizmus retencie je najpravdepodobnejšie sprostredkovaný receptormi a zahrnuje väzbu KDEL signálu na membránový receptor a rýchly návrat komplexu signálneho receptora v ER, pokiaľ je uvoľňovaný ako váčok [Pelham H. R. B., *TIBS* 15, 483-486 (1990)].

Geneticky modifikované proteíny nebývajú vždy nachádzané v ich prirodzenej celulárnej časti. Napríklad vysoko-Met fazeolín, exprimovaný v transgénom tabaku, je nachádzaný len v ER (endoplastickom retikule) Golgi cisternae a Golgi váčkoch. Fazeolín sa normálne akumuluje v matrici vakuol na ukladanie proteínu u vyvíjajúcich sa tabakových semien. Výsledky ukazujú, že vysoko-Met fazeolín je degradovaný buď v Golgi váčkoch alebo práve po vstupe do vakuol na ukladanie proteínu [Hoffman L. M. a spol., *Plant Mol. Biol.* 11, 717-730 (1988)]. Vysoká hladina akumulácie zásobného proteínu semien *Vicia alba*, vicilínu, s dodatočnou karboxy-terminálnou KDEL-sekvenciou bola publikovaná u tabaku a lucerny [Wandelt C. I. a spol., *Plant J.* 2, 181-192 (1992)]. Modifikované génové útvary zlúčené s 35S-promótorom mozaikového vírusu karfiolu a proteínom sa akumuluje v ER listov transgénnych rastlín. Podľa toho sa zdá byť pravdepodobné, že keď sú produkované geneticky modifikované zásobné proteíny, retencia v ER by mohla zamedzovať degradáciu, a že konštrukt DNA s 35S-promótorom mozaikového vírusu karfiolu by mohol byť aplikovaný v predkladanom vynáleze.

Kruciferín je hexamérom zo šiestich podjednotiek, z ktorých každá obsahuje jeden reťazec kódovaný jednotlivým génom [Rödin J., Rask L., *Physiol. Plant.* 79, 421-426 (1990)].

Napríklad u *Brassica napus* gény kruciferínu zdieľajú 60 % homológie medzi členmi. Druhým najviac prominentným proteínom v semenách *Brassica napus* je napín. Podobne ako subjednotky kruciferínu je napín jednotlivý génový produkt zložený z dvoch polypeptidových reťazcov, viazaných spolu disulfidovými mostíkmi. Obidva, kruciferín i napín, sú syntetizované na membráne ER ako prekursor obsahujúce na ER zacielený signál [Ericson M. L. a spol. *J. Biol. Chem.* 261, 14576-14581 (1986)].

Ako bolo uvedené skôr, ako kruciferín, tak aj napín obsahujú na svojom N-terminálnom konci na ER zacielenú signálnu sekvenciu. Proteíny vstupujú do ER v nerozvinutom stave a signálne sekvencie sa skoro po vstupe odštiepia. V nedávnych rokoch sa stalo zrejmé, že nie všetky proteíny vchádzajúce do ER sú ďalej spracovávané a zhľukované do vakuol. ER obsahuje tiež veľký počet proteínov, ktoré zostávajú v bunečnej dutine a napomáhajú počiatočným krokom v zrení vylučovaných proteínov. Mnohé z týchto proteínov boli vyznačené i v cicavčích systémoch [Pelham H. R. B., *TIBS* 15, 483-486 (1990)] a naznačujú, že glykozylácia génových produktov, zvlášť proteínov, je podobná ako u cicavcov, tak u rastlín. U rastlín bolo publikované, že napríklad proteín viažuci auxín je zadržiavaný v ER [Inohara N. a spol., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 3564-3568 (1989)].

Obvykle prvá skupina proteínáz objavujúca sa počas klíčenia sú SH-dependentné proteínázy, ktoré pôsobia na nerozpustné natívne ukladané proteíny. U *Vigna mungo* je syntéza SH-dependentnej proteínázy v kotyledóne iniciovaná bezprostredne po imbibícii a vzrastá až do štvrtého dňa, po ktorom klesá [Okamoto T. a Minamikawa T., *J. Plant Physiol.* 152(6), 675-682 (1998)]. Peptidy s krátkym reťazcom vznikajúce z aktivity endopeptidázy sú štiepené z natívnych proteínov a to zase zvyšuje ich citlivosť voči ďalším proteínázam.

Proteínázy druhej skupiny sú proti natívnym akumulovaným proteínom inaktívne, ale hydrolyzujú peptidy s krátkym reťazcom na oligopeptidy. V rov-

nakej dobe sú aktivované karboxypeptidázy a z peptidov sú uvoľňované aminokyseliny. K tejto proteolýze dochádza v hlavnom reťazci proteínu, z ktorého sa do cytosólu uvoľňujú oligopeptidy a aminokyseliny, a kde oligopeptidy sú ďalej degradované na aminokyseliny pomocou amino- a di- alebo tripeptidáz. Aminokyseliny, uvoľnené z uložených zložiek, sú ďalej metabolizované na hlavnú transportnú formu aminokyselín, asparagín a glutamín. Uložené proteíny predstavujú zdroj aminokyseliny pre proteíny *de novo* syntetizované počas klíčenia.

Druhé štádium postupu podľa predkladaného vynálezu zahrnuje klíčenie, pri ktorom surový materiál, nahromadený počas kultivácie do uložených rezerv semena dvojklíčnych rastlín, je mobilizovaný na produkciu požadovaných génových produktov. Postup pri klíčení je rýchly a náklady sú nízke. Objem produkcie nie je prakticky limitovaný, pretože surovina sa dá získavať z obnoviteľných zdrojov a požadovaný príkon energie sa získava zo slnka.

Klíčením sa v predkladanom vynáleze myslí vývojový fenomén, ktorý začína prijatím vody semenom dvojklíčnych rastlín a zvýšenou respiráciou a makromolekulárnymi syntézami, mobilizáciou uložených rezerv a subcelulárnymi štrukturálnymi zmenami. Fyziologicky je klíčenie krátkym javom končiacim nástupom predĺženia osi embrya. V predkladanom vynáleze zahrnuje klíčenie tiež rastovú fázu po nástupe predlžovania embryonálnej osi. Semeno nasáva nie viac než dvojnásobok alebo trojnásobok hmotnosti suchého semena, avšak neskôr pri vývoji sadenice je potrebné viac vody. Klíčenie zahrnuje početné javy, ako je zvýšená respirácia a makromolekulárne syntézy a subcelulárne štrukturálne zmeny. Klíčenie je spravidla dokončené s rozpínaním korienkov, ku ktorému dochádza bunečnou expanziou bez bunečného delenia. Existujú dva typy sadeníc klasifikovaných podľa osudu kotyledónu po klíčení. Pri raste hypogeálneho typu sadenice kotyledón s vyvíjajúcou sa sadenicou z pôdy nevystupuje. Hypokotyl zostáva krátky, ale epikotyl sa predlžuje a vyráža prvé pravé listy von zo zeme. U epigeálneho typu sadenice vystupujú narastajúce kotyledóny expandovaním hypokotylu. Kotyledóny sa obvykle stávajú fotochemicky aktívnymi pred výskytom pravých listov.

Keď semeno klíči v prírode alebo na poli, využíva rezervy kotyledónu na vyvolanie fyziologickej aktivity obvykle po pokojovom štádiu ako suché semeno. Vitálne funkcie vrátane expresie génov rýchlo narastajú. Počas klíčenia sa z rezerv uložených v kotyledóne uvoľňuje výrazné množstvo aminokyselín a iných biologických zlúčenín a potom sú viazané počas rastu sadenice.

Klíčenie môže byť u povrchovo sterilizovaných semien tiež iniciované inkubáciou semien vo vode alebo vo vode doplnenej o zlúčeniny, ktoré sú užitočné pre produkciu požadovaného génového produktu. Počas klíčenia je aktivovaná expresia génu na produkovanie požadovaného génového produktu. K iniciácii klíčenia sú semená najprv hydratované na obsah vlhkosti 40 - 50 % máčaním v tankoch s vodou, kde sa teplota adjustuje podľa druhu semena a prevzdušňovanie sa uskutočňuje stlačeným vzduchom. Po nasiaknutí sú semená premiestnené obyčajne do komôr so 100 %-nou vlhkosťou, aby vyklíčili. Typická teplota je medzi 10 - 30°C a časové rozsahy od 2 do 10 dní, lepšie 3 až 6 dní a najvýhodnejšie 4 až 5 dní.

V predkladanom vynáleze klíčiace semeno dvojkličných rastlín zahŕňa transgénny kotyledón, t.j. kotyledóny dvojkličných rastlín sú stabilne transformované DNA sekvenciou kódujúcou žiadaný génový produkt. Kotyledóny sú časťou embrya a slúžia ako orgán na ukladanie. Fyziologická štruktúra a diverzita bunčných typov v kotyledóne je relatívne jednoduchá. Mobilizácia hlavných rezerv uložených v kotyledóne začína po klíčení. V kotyledónoch sú počas narastania sadenice tri hlavné formy uložených materiálov, proteíny, olej a sacharidy, enzymaticky konvertované na transportovateľnú formu. Uložené proteíny sú postupne štiepené radom proteináz exprimovaných v bunkách kotyledónu. Proteinázy sú *de novo* syntetizované štrukturálnymi génmi regulovanými v oblasti promótoru fungujúceho v kotyledóne.

Počas klíčenia a nasledujúceho narastania vznikajúcej sadenice je mobilizácia uloženého lipidu iniciovaná lipolýzou čiastočiek oleja, ktorá z triacylglycerolu poskytuje glycerol a voľné mastné kyseliny. V úložných bunkách semena sú glycerol a mastné kyseliny konvertované na sacharózu zložitými reakciami vrátane tuctov enzýmov a aspoň glykozómov a mitochondriálnych organel. Sacharóza je premiestňovaná do vakuoly alebo embrya.

V mobilizačnom / produkčnom štádiu sú akumulované rezervy proteínu, sacharidu a lipidu využívané ako východiskový materiál a sú konvertované na obchodne zaujímavé produkty namiesto normálnych proteínov, ktoré sú produkované na utvorenie rastliny. Mobilizácia začína, ak sa pridajú semená k okolitému kvapalnému, polotuhému alebo tuhému médiu obsahujúcemu vodu, ktorá je prípadne doplnená fyzikálnymi alebo chemickými prostriedkami, počítajúc do toho výživu, klíčenie zavádzajúcimi faktormi, práve tak ako faktormi schopnými regulovať zrýchlenie a/alebo spomalenie určitých krokov pri produkcii (transkripciu, expresiu a/alebo sekréciu). Táto mobilizácia iniciuje klíčenie a produkcia postupuje až pokiaľ sa neobjavia zelené listy.

Bolo známe, že vážnym problémom vo fermentačnej technológii je kontaminácia. Pri produkcii v priemyselnom meradle je kontaminovaná výrazná časť (20 - 25 %) fermentačných vsádzok. S mikrobiálnym rastom počas procesu majú tiež problémy postupy, ktoré využívajú čerstvý rastlinný materiál, ako je výroba zemiakového škrobu alebo mokré mletie obilia. Čerstvý rastlinný materiál ako listy zobrať z poľa sú hlavným zdrojom kontaminácie, ktorá môže spôsobiť vážne straty konečného produktu.

Predkladaný vynález opisuje systém, ktorý využíva ako surovinu suché semeno. Na poli je expresia cudzieho génu len obmedzená, zatiaľ čo, pokiaľ sa týka prostredia, expresia sa bezpečne uskutočňuje hlavne v riadených podmienkach v továrni, namiesto podmienok poľných. Suché semená dvojkličných rastlín môžu byť povrchovo sterilizované ľahšie než semená jednokličných rastlín, pretože majú tuhú, hladkú šupku na rozdiel od zŕn jednokličných rastlín. Sterilizácia môže byť uskutočnená ošetrovaním chemikáliami ako je chlórnan, peroxid vodíka alebo inými dezinfikujúcimi zlúčeninami. Pretože dvojkličné semená majú na rozdiel od vrásčitej štruktúry povrchu jednokličných semien povrch hladký, je sterilizácia semien dvojkličných rastlín oveľa efektívnejšia. V dôsledku toho môže byť produkcia požadovaného cudzieho alebo natívneho génového produktu(ov) uskutočňovaná v sterilných podmienkach, čo je veľkou výhodou, najmä keď je cieľovým génovým produktom terapeuticky aktívny proteín, ale tiež preto, že môže byť zabránené mikrobiálnej degradácii konečného produktu.

Génový produkt môže byť získaný v podstate kontaminantu prostý, tiež ako kompozícia pochádzajúca zo sušeného semena rastliny, obsahujúca jeden alebo viac génových produktov akumulovaných počas klíčenia semena transgénnej dvojklíčnej rastliny, získaných najlepšie v bode maximálnej akumulácie prerušením procesu klíčenia. Génový produkt môže byť získaný ako postupne spracovávateľná zmes vyklíčených semien dvojklíčnych rastlín alebo v stabilnej forme na skladovanie. Zmes obsahuje napríklad proteíny, enzýmy, peptidy, hormóny, rastové faktory, vakcíny, aminokyseliny, vitamíny a/alebo antibiotiká.

Predkladaný vynález používa na vedenie syntézy k produkcii žiadaného génového produktu(ov) riadenú génovú expresiu a ako surovinový zdroj pre *de novo* syntézu transgénneho produktu používa aminokyseliny a iné génové produkty uvoľnené počas iniciácie klíčenia. Prírodné či natívne génové produkty napr. proteínázy, lipázy, amylázy, atď., vytvárané v klíčiach semenách, môžu byť využité ako substráty pre transgénny enzým alebo na vytvorenie žiadaných biochemikálií.

V predkladanom vynáleze je cieľom poskytnúť transgénnu rastlinu majúcu v sebe najmenej jeden expresívny systém, obsahujúci najmenej jednu DNA sekvenciu, kódujúcu najmenej jeden požadovaný génový produkt funkčne spojený s expresiou regulujúcimi sekvenciami, ktoré sú indukované alebo môžu byť indukované počas klíčenia a sú v podstate nečinné alebo môžu byť umlčané, keď sa dvojklíčna rastlina pestuje v poľných podmienkach. Promótor, aktívne v tme (podmienkach bez osvetľovania), v tomto prípade tak zvané "*camera obscura*" promótor, vrátane viac alebo menej od svetla nezávislých Rubisco-promótorov sú v expresívnom systéme predkladaného vynálezu výhodné.

Predkladaný vynález poskytuje možnosti produkovať rozdielne žiadané génové produkty, ale aj iné negénové biochemikálie. Transgén exprimovaný počas klíčenia produkuje prvý génový produkt, RNA, z ktorej možno získavať iné RNA-produkty ako také alebo po transformácii. RNA-štádium je obvykle prechodné a získaný génový produkt obsahuje proteíny. Principiálne existujú dva druhy proteínových produktov, enzýmy a produkty neenzýmové, ktorými sú často štrukturálne proteíny, vakcíny, hormóny, atď. Enzýmy sú schopné mo-

difikovať z rastliny získateľný endocelulárny substrát, ktorý je transformovaný na žiadanú biochemickú zlúčeninu. Alternatívne je pridávaný substrát extracelulárny, ktorý môže byť transformovaný, aby poskytol inú biochemickú zlúčeninu. Následne môže byť proteín, či už je to enzymatický alebo neenzymatický aktívny proteín, uvedený do styku s reagentom, v ktorom prípade sa získava derivát proteínu.

V predkladanom vynáleze sú heterológne cudzie gény alebo DNA sekvencie určené na optimálnu expresiu v klíčiach kotyledónoch dvojklíčnej rastliny. Sekvenčné charakteristiky medzi rastlinnými génmi a heterológnymi génmi sú overované, aby exprimovali cudzie transgénne gény z heterológnych zdrojov. Je prospešné porovnávať štruktúru týchto génov u rastlín so známymi rastlinnými génmi. Priekopnícka práca na tomto poli bola vykonaná s endotoxinovým génom (*cry*) *Bacillus thuringiensis*. Aby sa zvýšila expresia na AT bohatých *cry* génov v rastlinách, musí byť v originálnej génovej sekvencii uskuťtočnených niekoľko modifikácií.

Preferovanou transkripčnou štartovacou sekvenciou v rastlinách je AACA ATG G (veľmi konzervatívne pozície nukleotidov sú uvedené tučne). Z ukončovacích kodónov TGA, TAG a TAA je prvý mierne preferovaný a TAA je u jednoklíčnych používaný zriedka. Kodóny v génovej sekvencii môžu byť podľa tabuliek používania kodónov konvertované na vhodné pre rastliny. Konvertovaná DNA sekvencia by mala byť skúmaná na prítomnosť predpokladaných polôh znižujúcich v rastlinách expresiu. Predpokladané signálne sekvencie polyadenylácie v rastlinách sú AATAAA, AATAAT a ich variácie: AACCAA, ATATAA, AATCAA, ATACTA, ATAAAA, ATGAAA, AAGCAT, ATTAAT, ATACAT a AAAATA (najkonzervatívnejšie z A nukleotidov sú označené tučne). Predpokladané polohy spojovania vylúčené z génovej sekvencie boli CAN₇AGTNNA. Dodatočne by DNA sekvencia mala byť zbavená ATTTA sekvencie, ktorá je údajne mRNA degradačným elementom.

Transkripčné terminátorové sekvencie možno získať z rôznych génov exprimovaných v semene alebo iných rastlinných génov, napríklad z *Rubisco* génu. Terminátory z rôznych baktérií, napríklad z *Agrobacterium* môžu byť použité práve tak, ako *nos* gén alebo *ocs* gén. *Nos* gén kóduje nopalín syntetázu

[Depicter A. a spol., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 561-572 (1982); Shaw C. H. a spol., *Nucl. Acid. Res.* 12, 7831-7846 (1984) a An G. a spol., *Mol. Gen. Genet.* 203, 245-250 (1986)]. *Ocs* gén kóduje oktopín syntetázu [Koncz C. a spol., *EMBO J.* 3, 1597-1603 (1983); Dhaese P. a spol., *EMBO J.* 2, 419-426 (1983)].

RNA polymeráza II transkribuje proteín kódujúce gény v rastlinách v podstate rovnakou cestou ako v iných eukaryotických organizmoch. Vo všeobecnej polohe možno v eukaryotických bunkách nájsť veľmi podobné regulačné elementy v oblastiach iniciácie transkripcie (promótor). TATA oddiel je umiestnený 20 - 40 nukleotidov ležiacich nahor od miesta iniciácie transkripcie a kodón iniciácie translácie, ATG, je umiestnený 40 - 80 nukleotidov ležiacich nadol od miesta iniciácie transkripcie. V zrelej mRNA rámec voľného čítania sleduje ATG kód a končí jedným z troch ukončovacích kodónov UGA, UAG alebo UAA.

Pre transgénnu expresiu v rastlinách môžu byť použité promótory z rozdielnych zdrojov. Mnohé z nich pochádzajú z *Agrobacterium ssp.* a z rastlinných vírusov ako konštitutívne exprimovaný *Agrobacterium nos* promótor a 35S promótor mozaikového vírusu karfiolu. Špecifické promótory tkaniva sú vhodné pri aplikáciách, kde je nutná expresia v špecifických tkanivách. Špecifické promótory tkaniva sú tiež vývojovo kontrolované tak, že sú aktívne len v určitom vývojovom štádiu tkaniva. V predkladanom vynáleze je vhodné, že promótor je pre klíčiace semeno špecifický.

Rubisco (ribulóza-1,5-bifosfát karboxyláza / oxygenáza) predstavuje až do 50 % celkového proteínu v klíčiacom kotyledóne. Je najhojnejším rastlinným proteínom, ktorý katalyzuje reakcie, pri ktorých kondenzuje CO₂ molekula s 1,5-bifosfátom ribulózy za vytvorenia dvoch molekúl 3-fosfoglycerátu. Rubisco je umiestnený na stromálnom povrchu membrán tylakoidov. Enzým pozostáva z ôsmich veľkých podjednotiek kódovaných genómom chloroplastu a ôsmich malých podjednotiek. Malá podjednotka je kódovaná druhom multigénov jadra (*rbcS* gény). Malá podjednotka je syntetizovaná na cytoplazmatických polyzómoch ako prekurzorový proteín. Je transportovaný do plastidov a spracovaný pred kompletizovaním holoenzýmu. Expresia *RbcS* génu je špeci-

fická pre tkanivo a vývojové štádium a je ovládaná fytochrómnym systémom pomocou svetla.

V predkladanom vynáleze najpreferovanejší génový produkt alebo systém produkcie proteínu používa promótor malej podjednotky génu Rubisco. Promótory malej podjednotky génu Rubisco môžu byť izolované z kotyledónov *Brassica campestris* pestovanej v tme (*camera obscura*) alebo bez svetelných podmienok. Tento druh promótoru môže produkovať cudzie proteíny na veľmi vysokej úrovni. Naša práca ukázala, že okolo 50 % všetkých *de novo* syntetizovaných proteínov v tme klíčiacími kotyledónmi *B. campestris* sú malé a veľké podjednotky proteínov Rubisco. mRNA úroveň transkriptu natívneho *RbcS* génu je vysoká ako 500 pg na µg celkovej RNA v klíčiach semenách. Maximálna expresia sa dosahuje asi 60 hodín po začiatku imbibície. Podobné výsledky boli uvedené u mRNA úrovni transkriptu prírodného *RbcS* génu *Brassica napus* [Fiebig C. a spol., *Bot. Acta* 103 (3), 258-265 (1990)]. Aby sa zvýšila expresia, môže sa klíčiace semeno osvetľovať viditeľným svetlom kratší alebo dlhší čas. Na potlačenie aktivity prírodného *rbcS* promótoru môžu byť pridávané monosacharidy, disacharidy alebo oligosacharidy, najlepšie sacharóza alebo glukóza. Ak je z transgénneho promótoru odstránený na sacharózu odpovedajúci element, nebude sacharózou potlačovaný. Ak je produkované menej Rubisco enzýmu, zostáva pre transgénnu expresiu viac voľných aminokyselín. Na reguláciu znižovania expresie endogénneho *rbcS* génu môžu byť použité aj opačné technológie: exprimovanie opačného *rbcS* génu v klíčiacom semene.

Vzhľadom na to, že Rubisco je najhojnejším rastlinným proteínom, bol v predkladanom vynáleze používaný ako preferovaný promótor, avšak systém expresie podľa predkladaného vynálezu nie je žiadnym spôsobom obmedzený na používanie tohto promótoru. Výhodný transgénny kotyledón na produkciu proteínov obsahuje promótorový systém na produkciu proteínov a v kotyledónoch zahrnuje najvýhodnejšie vysoko aktívny, svetelne indukovateľný Rubisco promótor. Screeningom Rubisco cDNA exprimovaných v kotyledónoch, najmä v podmienkach bez osvetľovania, je možné produkovať iné vysoko expresívne Rubisco promótory. cDNA môžu byť produkované pomocou RT-PCR s použitím oligo-T-primérov a sekvencií z 5'-konca kódujúcej sekvencie vysoko zachova-

ného Rubisco. Vysoko expresívne cDNA môžu byť v kotyledóne sekvenované a ako skúška na detekciu úrovni exprimácie v rastlinných tkanivách môže byť použitá variabilná 3' netranslatovaná oblasť (UTR). Využitím databáz cDNA sekvencií a použitím rôznych metód, môžu byť izolované promótory exprimujúce v podstate len v kotyledónoch. Podobným spôsobom je možné využiť cDNA informáciu, aby poskytla iné, pre semeno v podstate špecifické a pre klíčenie aktivované a/alebo indukovateľné promótory, na tomto mieste nazývané *camera obscura* - promótory.

Mnohé proteinázy a lipázy sú exprimované v kotyledónoch klíčiacich semien špecificky. Jedna z najlepšie charakterizovaných je *Vigna mungo* sulfhydryl-endorpeptidáza (SH-EP), ktorá je syntetizovaná *de novo* v kotyledónoch krátko po imbibícii. Všeobecne vzrastá množstvo SH-EP mRNA až do tretieho alebo štvrtého dňa. Oblasť SH-EP promótoru (číslo génovej banky: EMBL X51900) je spojená s GUS génom, aby sa uľahčilo meranie úrovne expresie počas klíčenia dvojklíčneho semena.

Okrem promótorov regulovaných v tkanive špecifickým spôsobom, môžu byť použité indukovateľné promótory, ktoré môžu byť aktivované rôznymi stimulmi. Trieda génov známa ako tepelne šokové alebo stresové gény sa vyskytuje vo všetkých organizmoch, od baktérie až po človeka. Transkripcia týchto génov je iniciovaná po účinku stresu (napr. tepelnom šoku) a translácia transkriptu produkuje proteíny, ktoré pravdepodobne dočasne chránia bunku. Produkcia tepelne šokových mRNA a proteínov je len prechodným fenoménom a expresia tepelne šokových génov sa ustáli po niekoľkých hodinách a potom klesá. Pokiaľ teplota vzrastá skôr pomaly ako naraz, organizmus môže vzdorovať teplotám, ktoré by inak mohli byť smrteľné, t.j. organizmus sa na vyššie teploty môže adaptovať. Aby sa zvýšila aktivita tepelne šokových promótorov, môžu byť klíčiace semená zahriate. Bolo ukázané, že úroveň tepelne šokovej (HS) mRNA u sóje vzrastajú od sotva zistiteľnej úrovne až do 15 000 - 20 000 kópií po dvoch hodinách ošetrovania pri 40°C. Ako indukovateľný promótor môže byť v expresívnom systéme podľa predloženého vynálezu využitá tiež oblasť HS promótoru opísaná v US patente 5 447 858. HS promótor klonovaný

PCR je spojovaný s GUS génom na meranie úrovne expresie počas klíčenia semena.

Niektoré typy hydrolytických enzýmov sú syntetizované *de novo* a pôsobia v klíčiach semenách, kde sú mobilizované uložené rezervy. Konverzia uložených rezerv na transportovateľnú formu, ako triacylglycerolu na sacharózu, zahŕňa niektoré vysoko exprimované gény ako izocitrátovú lyázu a jablčnanovú dehydrogenázu. Promótor z týchto génov môžu byť využité na expresiu transgénov. Indukovateľný salicylátový promótor z tabakovej rastliny, *Nicotiana tabacum*, môže byť klonovaný pomocou PCR. Môže byť využitý na exprimáciu heterológnych génov v klíčiach semenách.

Veľkou výhodou predkladaného vynálezu z hľadiska životného prostredia je, že cudzí gén nie je exprimovaný pri kultivácii v poľných podmienkach. Gén je množený a zberaný spolu s uloženými rezervami, zatiaľ čo na klíčenie obmedzená expresia cudzieho génového produktu môže byť uskutočňovaná za definovaných podmienok.

Podľa predkladaného vynálezu môže byť v zásade produkován akýkoľvek komerčne zaujímavý génový produkt. Tieto génové produkty zahŕňajú enzýmy, ktoré sú pre rastliny heterológne. Inými slovami, nie sú natívne pre rastlinné druhy, v ktorých sú produkované. Zahŕnuté sú tiež enzýmy, ktoré sú homologické pre rastliny, v ktorých sú produkované. Zmienené homologické proteíny sú obvykle preexprimované použitím rekombinantných DNA techník. Záujem je o enzýmy, ktoré zahŕňajú, avšak nie sú obmedzené na hydrolázy ako proteázy, β -glukanázy, celulázy, hemicelulázy, fosfatázy, lipázy, fosfolipázy, pektinázy, amylázy, amyloglykozidázy, lysozýmy, pullulanázy a chitinázy, peroxidázy rovnako ako lyázy ako pektinolyáza a izomerázy ako izomeráza glukózy.

Pomocou postupu a produkčného systému podľa predkladaného vynálezu je tiež možné produkovať štrukturálne proteíny. Niektoré zaujímavé uskutočnenia predkladaného vynálezu sú napríklad pre kolagén, spidroín, proteín hodvábu, ale produkované môžu byť i mnohé iné druhy proteínových génových produktov, počítajúc do toho inhibitor trypsínu, terapeutické peptidy ako interfe-

róny, inzulín, neuropeptidy, enkefalín, somatostatín, atď. Produkované môžu byť tiež ďalšie polyaminokyseliny ako polylyzín a polyglutamát, rovnako ako vlákna, membrány, povlaky, terapeutiká alebo liečivá, prostriedky proti zubnému kameňu, potravinové alebo krmivové aditíva a vakcíny ako LTB a rastové faktory ako GM-CSF. Môžu byť syntetizované aj neproteínové génové produkty vrátane poly- β -hydroxybutyrátu.

Pretože *de novo* syntéza je počas klíčenia rýchlo prebiehajúcim prechodným stavom, musí byť klíčenie prerušené alebo zakončené pred tým, než požadovaný génový produkt začne ubúdať. To môže byť dosiahnuté získaním požadovaného génového produktu pred tým, než jeho koncentrácia klesne, zastavením klíčenia buď zahriatím, kodínom- N_2 (umelým vysušením) alebo alternatívne rozdrvením či excíziou dvojkľíčnych semien vrátane sadenic. Pokiaľ je klíčenie zastavené zahriatím, môže byť žiadaný génový produkt získaný ako surový vysušený produkt, s dobrou skladovateľnosťou, čím sa rozumie, že taktiež enzým môže byť opäť získaný v surovej forme stabilnej pre skladovanie. Syntéza požadovaného proteínu môže byť tiež zastavená pri jej vrchole rozdrvením alebo excíziou klíčiaceho semena. Ak je klíčenie zastavené excíziou alebo rozdrvením, môže byť génový produkt získaný ako surová zmes a môže byť použitá ako taká, alebo môže byť ďalším postupom spracovaná, t.j. formulovaná, uskladnená a transportovaná a uskladnená. Výhodne sa používa ako taká, napr. pri biotransformačných procesoch. Žiadané génové produkty môžu byť pochopteľne izolované a rafinované bežne známymi konvenčnými metódami.

Ak je génový produkt používaný pre biotransformáciu, uvedie sa do styku so substrátom, t.j. určitou zlúčeninou alebo zmesou zlúčenín, t.j. génový(é) produkt(y), často enzým(y) sa nechá reagovať so zlúčeninami v substráte. Buď génový produkt, napr. enzým pôsobí ako katalyzátor a modifikuje zlúčeninu(y) v substráte alebo alternatívne substrát alebo činidlo obsahuje najmenej jednu substanciu alebo zlúčeninu schopnú modifikovať génový produkt, napríklad môže byť modifikovaný spôsob jeho skladby, môže byť uskutočnená glykozylácia alebo deglykozylácia, alebo môže byť opatrený substituentom, aby sa uľahčilo spojenie génového produktu s inými produktmi.

V predkladanom vynáleze je po klíčení substrát génovým produktom obohatený v podmienkach, kde môže byť produkovaný žiadaný génový produkt. Zo semien pochádzajúca zmes obsahuje kotyledóny, hypokotyly, pakoreň a u rastlín hypogeálneho typu tiež epikotyl a niekedy malé primárne listy. Génový produkt môže byť extrahovaný alebo ponechaný v zmesi.

Génový produkt môže byť proteínom, kódovaným génom poskytovaným expresívnym systémom predkladaného vynálezu, alebo niektorou inou biochemickou zlúčeninou produkovanou transgénny enzým, keď sú klíčením mobilizované natívne génové produkty uložené v semene a použité ako také a ponechané pôsobiť na exogénne pridaný substrát, aby sa postarali o žiadajú (bio)transformáciu substrátu.

Ak je génový produkt zo zmesi extrahovaný, môže byť použitý buď v čerstvej alebo vysušenej forme. Sušenie môže byť uskutočnené v sušiarňe vyhrievanej na 40 °C – 80 °C alebo v lyofilizátore pri –20 °C až –80 °C. Vysušený materiál môže byť rozdrvený alebo rozpráškovaný. Pred extrakciou môže byť zmes mechanicky rozrušená a/alebo enzymaticky ošetrovaná, čo uvedie celkový proteín do kašovitej zmesi alebo roztoku. Bunečný odpad môže byť potom oddelený akýmkoľvek bežným spôsobom ako centrifugáciou, sedimentáciou a/alebo filtráciou.

Supernatant alebo filtrát bude obsahovať obvykle 1 - 40 % hmotn. požadovaného génového produktu z celkového proteínu v médiu, výhodne najmenej okolo 30 % hmotn.

Keď nie je žiadaný produkt vo vode rozpustný, môže byť napríklad extrahovaný vhodným rozpúšťadlom. Prípadný je aj iný postup, ktorý umožní re-naturáciu alebo solubilizáciu a/alebo extrakciu produktu bez straty aktivity požadovaného produktu.

Po izolácii proteínu, o ktorý je záujem, z vodného prostredia, môže byť génový produkt rafinovaný konvenčnými postupmi. Keďže génový produkt bude zahrňovať podstatnú časť celkového proteínu prítomnú v zmesi, často predstavujúcu najväčší percentuálny obsah nejakého individuálneho proteínu, je rafinácia ohromne zjednodušená. Navyše ďalej kontaminanty v produkte po rafi-

nácii nepredstavujú pravdepodobne fyziologickú záležitosť pre nejakú z aplikácií génových produktov vrátane terapeutických aplikácií.

Pokiaľ nie je génový produkt z kompozície extrahovaný, ale je v nej ponechaný, môže byť taktiež získavaný v čerstvej alebo vysušenej forme. Sušenie môže byť uskutočňované ako je opísané vyššie. Vysušený materiál môže byť ďalej rozdrvený alebo rozpráškovaný. Čerstvý materiál môže byť rozmelený mechanickým narušením alebo enzymatickým pôsobením. Vysušený i čerstvý materiál môže byť používaný ako zdroj génového produktu. Ak je génovým produktom enzým, môžu byť vhodné substráty pridávané do vodnej zmesi alebo do vysušenej zmesi, alebo môže byť použité ako čerstvý materiál.

Pri jednom uskutočnení predkladaného vynálezu môžu byť ako doplnok krmivových zmesí použité naklíčené dvojklíčne semená, kotyledóny a/alebo sadenice, obsahujúce jeden alebo viac proteínov, o ktoré je záujem. Naklíčené semená dvojklíčnych rastlín môžu byť miešané s normálnymi netransgénymi semenami, aby sa v krmivovej zmesi pre zvieratá získala žiadaná koncentrácia génového produktu, o ktorý je záujem.

Zmesi alebo kompozície získané z naklíčených semien môžu byť sušené a skladované. Génové produkty môžu byť izolované alebo ponechané v materiáli, napríklad, keď je rekombinantný proteín užitočný pre aplikácie v krmive. Génové produkty môžu byť využité na zvýšenie proteínovej hodnoty zvieracieho krmiva alebo môžu byť napríklad rastovým hormónom alebo vakcínou. Taktiež môžu byť produkované labilné alebo toxické substancie prísne kontrolovaným spôsobom, ktorý kombinuje účinnú produkciu proteínu s ekologickými aspektami a poľnohospodárskymi záujmami.

Vynález je podrobnejšie opísaný nižšie. Príklady a experimentálne podrobnosti sú uvádzané, aby skúseným odborníkom poskytli lepšie pochopenie a návod.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1A ukazuje naklíčené transgénne semeno exprimujúce GUS gén. GUS gén je spojený s promótorom tepelného šoku sóje. Na pravej strane je uvedená netransformovaná kontrolná sadenica.

Obrázok 1B ukazuje naklíčené transgénne semeno exprimujúce GUS gén. GUS gén je spojený s promótorom endopeptidázy.

Obrázok 1C ukazuje naklíčené transgénne semeno exprimujúce GUS gén. GUS gén je spojený s indukovateľným promótorom salicylátu.

Obrázok 1D ukazuje naklíčené transgénne semeno exprimujúce GUS gén. GUS gén je spojený s 35S promótorom.

Obrázok 2 ukazuje bezfarebný substrát β -glukuronidu (100 μ g/ml), ktorý je enzymaticky konvertovaný na modro sfarbenú glukopyranozidurónovú kyselinu a aglykón GUS enzýmom, produkovaným naklíčeným transgénnym semenom.

Obrázok 3 zobrazuje rôzne štádiá klíčenia semena *Brassica campestris* označené ako dni po začiatku klíčenia.

Obrázok 4 ukazuje SDS-PAGE gél naklíčených semien. Vzorky boli odobierané denne, počínajúc od suchého semena. Uložené proteíny a Rubisco podjednotky sú označené v Coomassie ofarbenom géle. Po troch dňoch klíčenia za deň produkované množstvo Rubisco proteínu výrazne vzrástlo, ako je viditeľné na obrázku demonštrované.

Obrázok 5 ukazuje výsledky northern blot analýzy naklíčených semien s použitím sond RNA. Vzorky boli zberané denne počínajúc od suchého semena.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Expresia GUS génu v klíčiach semenách *Brassica campestris*

Expresia GUS génu je demonštrovaná histochemickou analýzou. Na reguláciu expresie GUS sa používajú štyri rôzne promótoxy. Použitými promótoymi sú promótor tepelného šoku sóje, promótor endopeptidázy *Vigna mungo*, *Nicotiana tabacum* pr-promótor a CAMV 35S promótor. Sekvencie promótoru sú produkované pomocou PCR s použitím totálnej DNA rastliny ako templátu.

Promótoxy boli napojené na GUS gén s použitím *NcoI* enzýmu. Útvary promótor-GUS boli klonované vo vektore transformácie rastliny, pGPTV-hpt [Becker a spol., *Plant Mol. Biol.* 20, 1195-97 (1992)]. *B. campestris* bola transformovaná podľa protokolu, ktorý opísal Kuvshnikov V. a spol. [*Plant Cell Reports* 18, 773-777 (1999)]. Transgénne rastliny boli pestované v skleníku dokým nedali semená. Transgénne semená boli naklíčené a použité na histochemickú analýzu GUS.

Výsledky sú opísané na obrázkoch.

Na ľavej strane na obrázku 1A je zobrazené naklíčené transgénne semeno *B. campestris* exprimujúce GUS gén. GUS gén je spojený s promótorom tepelného šoku sóje. Na pravej strane je zobrazená netransformovaná kontrolná sadenice.

Na obrázku 1B je zobrazené naklíčené semeno transgénnej *Brassica campestris* exprimujúce GUS gén. GUS gén je spojený s promótorom endopeptidázy.

Na obrázku 1C je zobrazené naklíčené semeno transgénnej *Brassica campestris* exprimujúce GUS gén. GUS gén je spojený s indukovateľným promótorom salicylátu.

Na obrázku 1D je zobrazené naklíčené semeno transgénnej *Brassica campestris* exprimujúce GUS gén. GUS gén je spojený s 35S promótorom.

Obrázok 2 ukazuje bezfarebný roztok pufru obsahujúci substrát β -glukuronidu (100 μ g/ml), ktorý je pôsobením GUS enzýmu produkovaného naklíčeným transgénnym semenom enzymaticky konvertovaný na modro sfarbenú glukopyranozidurónovú kyselinu a aglykón.

Obrázok 3 zobrazuje rôzne štádiá klíčenia semena *Brassica campestris* označené ako dni po počiatku klíčenia. Povrchovo sterilizované semená boli klíčené v podmienkach *in vitro*, osvetľované 16 hodín pri teplote 22 °C a bez osvetľovania (v tme) boli 8 hodín pri teplote 18 °C.

Obrázok 4 ukazuje SDS-PAGE gél naklíčených semien. Vzorky boli odobierané denne počínajúc od suchého semena. Materiál bol homogenizovaný v kvapalnom dusíku a resuspendovaný v 50 mM Tris, pH 8,0, v prítomnosti 850 mM NaCl. Po centrifugácii bol číry supernatant zmiešaný s plniacim pufrom. Zásobné proteíny a Rubisco podjednotky sú označené v Coomassie sfarbenom géle. Po troch dňoch klíčenia je množstvo Rubisco proteínu produkované za deň výrazné.

Obrázok 5 ukazuje výsledky northern blot analýzy naklíčených semien s použitím sond RNA. Vzorky boli zberané denne, počínajúc od suchého semena. Sonda pozitívnej (antisense) sekvencie obsahuje 197 bp od exónu 3 a 153 bp od 3'-UTR oblasti malej Rubisco podjednotky cDNA (nepublikované). Sonda sa generuje z "pBluescript" plazmidu T7 promótorom s použitím DIG-UTP v reakcii. Každý pruh bol naplnený s 3 µg celkovej RNA. RNA bola extrahovaná a pri tom bol použitý "Qiagen RNeasy Plant Mini Kit". Hybridizácia bola uskutočnená s "DIG Easy Hyb" pufrom, v podstate podľa návodu výrobcu.

Príklad 2

Preparácia nových rbcS promótorov pre expresívny systém

a. Izolácia nového rbcS-promótoru

Rbc cDNA klony boli sekvenované zo štyri dni starých transgénnych kolytledónov *Brassica campestris*. Klony boli rozdelené na dve skupiny s podobnými charakteristikami založenými na sekvencii 3'-UTR oblasti.

SDS-PAGE analýza sadeníc *Brassica campestris*.

Semená *Brassica campestris* boli klíčené v sériách 1 až 7 dní. Päť párov kotyledónov bolo mletých v kvapalnom dusíku a resuspendovaných v pufre [50 mM Tris HCl, pH 8,5, 2 % SDS, 0,1 % brómfenolovej modrej, 2 % merkaptotanolu (2-ME)] zavádzajúcim lýzu. Vzorky boli desať minút varené na vodnom kúpeli a analyzované v 15 % SDS-PAGE géle podľa Laemmliho (1970). Bolo stanovené, že expresia *Rbc* génu začala 4 dni po imbibícii.

b. Rafinácia RNA z kotyledónov *Brassica campestris*.

RNA bola rafinovaná zo štyri dni starých kotyledónov pomocou "Qiagen RNeasy Kit".

c. Syntéza cDNA bola uskutočnená z totálnej RNA kotyledónov *Brassica campestris*.

2 µg totálnej RNA a 10 ng *notI*-d(T) priméru v 16 µl vody bolo inkubovaných 5 minút pri teplote 70°C. Zmes bola prenesená na ľad a bolo pridaných 5 µl z 5 x reakčného pufra, 2,5 µl 5 mM dNTP, 20 U inhibítora ribonukleázy a 200 U M-MLV reverznej transkriptázy. Reakčná zmes bola inkubovaná 1 hodinu pri teplote 42°C.

d. PCR-amplifikácia cDNA klonov exprimovaných v bunkách kotyledónu.

PCR bola najprv optimalizovaná použitím sérií dvanástich primérov tvorených tymínovými nukleotidmi a meniacim sa dinukleotidovým zakotvením ako 3'-primérom a 49-mérnym oligonukleotidom z počiatočnej oblasti *rbc* génu *Brassica napus* (prístupové číslo génovej banky g17849) exón číslo III ako 5'-primérom. Počiatočná optimalizácia ukázala, že v produkte PCR ako 3'-primér bol výsledkom len GCT₁₁. Aby sa klonoval tento produkt PCR, bol konštruovaný 49-mérny oligonukleotid s *NotI*-reštrikčným miestom. Priméry sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1

Priméry použité na PCR-izoláciu Rubisco cDNA klonov

3'-Priméry pre počiatkový screening:	
1	5'TTTTTTTTTTCA3' (SEQ.ID:1:)
2	5'TTTTTTTTTTCT3' (SEQ.ID:2:)
3	5'TTTTTTTTTTCC3' (SEQ.ID:3:)
4	5'TTTTTTTTTTCG3' (SEQ.ID:4:)
5	5'TTTTTTTTTTGA3' (SEQ.ID:5:)
6	5'TTTTTTTTTTGT3' (SEQ.ID:6:)
7	5'TTTTTTTTTTGC3' (SEQ.ID:7:)
8	5'TTTTTTTTTTGG3' (SEQ.ID:8:)
9	5'TTTTTTTTTTAA3' (SEQ.ID:9:)
10	5'TTTTTTTTTTAT3' (SEQ.ID:10:)
11	5'TTTTTTTTTTAC3' (SEQ.ID:11:)
12	5'TTTTTTTTTTAG3' (SEQ.ID:12:)
5'-Primér (SEQ.ID:13:):	
5'-CGCGGATCCACGGGTTTGTGTACCGTGAGCACGGAAGCACCCCCGGAT3'	
3'-Primér na klonovanie rbc cDNA-klonu (SEQ.ID:14:):	
5'AAGGAAAAAAGCGGCCGCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC3'	

Na klonovanie *rbc* cDNA fragmentu bola PCR-amplifikácia uskutočnená tak, že ako templát bol použitý 1 µl reakčnej zmesi zo syntézy cDNA, 100 nM 5'-priméru, 100 nM 3'-priméru, 100 µM dNTP a 1,25 U *Pfu* DNA-polymerázy/ 25 µl reakčného objemu. Získaný PCR-fragment bol klonovaný do *NotI* a *Bam*-HI-miest pUK21-vektora. Bolo sekvenovaných sedem individuálnych klonov. Podľa sekvencie boli klony rozdelené do dvoch skupín obsahujúcich 3 podobných respektíve 4 podobných reprezentantov. Jeden reprezentant z oboch skupín bol zvolený pre ďalšie štúdie. Sekvencie boli pomenované *utr2* (SEQ.ID:15:) a *utr8* (SEQ.ID:16:).

utr2-sekvencia (SEQ.ID:15:):

TTCGCGTTGT AAGACATTTC ATAAATAATA TCTACCTCAT
TTCATTTCCA TTTGTCTGTTT TCTTTGGCTTT TTGTTTCTGA
GGCATGTTAT ATCGGATTGT CAAGTGTCTG ATTTATGAAC
AACATGTAAT CTCTATATGC ATATTTCT

utr8-sekvencia (SEQ.ID:16:):

TTCGCTTTCA TATAATAATA TCTTCCTCAT TTCATTTCCA
ATAAGTCTGT TTCTTTTTTC TCTTTGGATT TCTGTTACGA
GACTTTCTAT ATCGGATTGT AAAATGTCTG ATTTTATGAA
CATGTAATTT CGG CAAATA

e. Klonovanie malej podjednotky Rubisco promótoru Typu I (65A) *Brassica campestris*.

2,8 kb fragment nesúci promótor a gén zodpovedajúci UTR 65A (SEQ.ID:24:) bol amplifikovaný s použitím bnrbl (SEQ.ID:17:) (5'-GAATTCTAACGACCCTTTTCCG-3'), ktorý je komplementárny k malej podjednotke Rubisco génu *B. napus* ako 5'-primér a UTR2 (SEQ.ID:18:)

(5'-GGCCACACTTGACAATCCGATATAACATGCCTCA-3'), ktorý je špecifický pre UTR 65A (SEQ.ID:24:) ako 3'-primér. Amplifikácia bola uskutočnená s Pfx Platinum DNA polymerázou (Life Technologies) podľa odporúčaní výrobcu. Oblasti promótoru boli amplifikované s použitím získaného fragmentu ako templátu. Bnr3 (SEQ.ID:19:) (5'-AAAAAGCTTCTAGACCCTTTTCCGTCAT AAGTTTTATA-3'), ktorý je komplementárny k malej podjednotke Rubisco génu *B. napus* bol použitý ako 5'-primér a RbSiB (SEQ.ID:20:) a RBNCO (SEQ.ID:21:) ako 3'-priméry v oddelených reakciách.

RbSiB (5'-CAGGTCTCCCATGCAGCTAACTCTTCCTCCGTTGCT-3') má 3'-zakončenie komplementárne k zakončeniu predpokladaného chloroplastu mieriaceho na signálny peptid malej podjednotky Rubisco génu *B. napus* a 5'-zakončenie, ktoré nesie Eco311 miesto, ktoré po skrátaní zanecháva ATG-obsahujúce NcoI miesto, kompatibilný koniec na klonovanie do expresívnych vektorov rastliny.

RBNCO (SEQ.ID:21:) (5'-GAGGAAGCCATGGCTACTTCTT-3') je kompatibilný s počiatkom kódujúcej oblasti malej podjednotky Rubisco génu *B. napus*, až na zmenu dvoch nukleotidov, ktorá vytvára *NcoI* miesto okolo ATG kodónu.

f. Vyhodnotenie fondu mRNA kódujúcej malú podjednotku ribulóza-1,5-bifosfát-karboxylázy v listoch a sadeniciach *Brassica campestris*

Totálna RNA bola s použitím "RNeasy Kit (Qiagen)" izolovaná zo zre-
lých listov a štyri dni starých sadeníc. Mediátorová RNA bola ďalej na kolóne s
"Oligo (dT) Cellulose" rektifikovaná podľa odporúčania výrobcu (New England
Biolabs). K syntéze fondu totálnej cDNA boli použité oligo T-primér
(SEQ.ID:22:)(CUACUACUACAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TVN) a reverzná transkriptáza Moloney-vírusu myšej leukémie (Promega). Ru-
bisco malé podjednotky cDNA boli amplifikované pri aplikácii dvoch cyklov
PCR (1 min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C) PCR primérov; oligo T priméru a
priméru, ktorý rozoznáva koniec posledného exónu Rubisco malej podjednotky
(SEQ.ID:23:) (CAUCAUCAUTCGACGATCATCGGATTCGACA). PCR
produkt bol digеровaný s uracil DNA glykozylázou a klonovaný na pAMP1
vektor (CloneAMP pAMP System LIFE TECHNOLOGIES). Celkom 102 klonov
bolo analyzovaných DNA sekvenovaním. 42 klonov pochádzalo z klíčiacych sa-
deníc a 60 zo zre-
lých listov. Boli nájdené tri rôzne typy mRNA (Typ I, II a
III). Sekvencie a percentuálny obsah distribúcie rôznych typov sekvencií v klí-
čiacich sadeniciach a zre-
lých listoch sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2

Sekvencie a percentuálny obsah distribúcie rôznych typov sekvencií mRNA

Sekvencia	Klíčiaca sadenica	Zrelý list
Typ I	29 %	26 %
Typ II	15 %	30 %
Typ III	56 %	44 %

Sekvence troch rôznych typov mRNA sú nasledujúce:

Typ I (SEQ.ID:24:)

TTAATTCGCGTTGTAAGACATTTTCATAAATAATATCTACTCATTTTCATTTCCAT
TTGTCTGTTTTCTTTGGCTTTTTGTTTCTGAGGCATGTTATATCGGATTGTCAAGT
GTCTGATTTATGAACATGTAATCTCTATATTGCATATTTTCTTCTTGGAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Typ II (SEQ.ID:25:)

TTAATTTGCTATGACATTCACATAATAATCTCTGCTCATTTTCATTTCCAATTGT
CTGTTTCTTTTCCCTTTGGTTTTCTGTTTCTCAGACATTCTATATCGGATTGTC
AAATGTGTGATTGTGAACATGTAATCTCTATATTGCTTCTTCGTCTTGGTAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Typ III (SEQ.ID:26:)

TTAATTCGCTTTCATATAATAATATCTTCTCATTTTCATTTCCAATAAGTCTGTTT
CTTTTTTTCTCTTTGGATTTCTGTTACGAGACTTTCTATATCGGATTGTAAAAT
GTCTGATTTTATGAACATGTAATTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

g. Klonovanie najhojnejšieho génu Rubisco malej podjednotky *Brassica campestris*

Jeden z génov Rubisco malej podjednotky *B. campestris* predstavuje 56 % transkriptu podľa kvantitatívnej sekvenčnej analýzy 102 klonovaných UTR-klonov Rubisco malej podjednotky. Tento klon bol pomenovaný UTR56 (Typ III, SEQ.ID:26:). S cieľom klonovania zodpovedajúceho génu a jeho nahor smerujúcej oblasti boli navrhnuté štyri priméry na použitie vo dvojstupňovej PCR. V prvej PCR bol ako 5'-primér použitý primér bnr4 (SEQ.ID:27:) (5'-GGCCATGAATTCTAACGACCCTTTTCC GTCATAAAAGT-3'), ktorý je súčasťou génu Rubisco malej podjednotky *B. napus* (prístupové číslo x61097). ako 3'-primér bol použitý primér 56r6 (SEQ.ID:28:) (5'-CGCGATATAGAAATTACATGTTTCATAAAATCAGACATTTTAC-3'), špecifický pre UTR56 (SEQ.ID:26:). Zloženie prvej PCR bolo: 75 mM Tris, pH 8,0

pri 25°C, 20 mM (NH₄)SO₄, 0,01 % Tween 20, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,2 µM primérov, 0,025 jednotiek / µl *Taq* DNA polymerázy, 0,0016 jednotiek / µl *Pfu* DNA polymerázy a 100 pg / µl DNA *B. campestris*. Program bol: 94 °C, 4 minúty, 30 X [(94°C, 30 s), (38°C, 30 s), 72°C, 3 min)]. Očakávaný 2,8 kb fragment bol rafinovaný z agarózového gélu. Pretože tu nebola istá informácia o sekvencii, bol fragment reamplifikovaný s použitím bnr5 (SEQ.ID:29:) (5'-GAGGTACCCGCGGCCGC GAATTCTAACGACCC TTTCCGTCATAAA-AG-3'), ktoré má 3'-zakočnenie komplementárne k bnr4 (SEQ.ID:27:) a extenziu 5'-zakočnenia, ktoré nesie *NotI* miesto skrátenia 8-bázy a 56r7 (SEQ.ID:30:)(5'-GAGAATTCGGCGCGCCATAGAAATTACATGTTCATAAATCAGACA-3'), ktoré má 3'-zakočnenie komplementárne k 56r6 (SEQ.ID:28:) a extenziu 5'-zakočnenia, ktoré nesie *AscI* miesto skrátenia 8-bázy. Zloženie PCR bolo podobné ako u prvého PCR s nasledujúcimi modifikáciami: 25 pg / µl na géle rafinovaného fragmentu z prvého PCR bolo použité ako templát a bolo uskutočnených len 7 cyklov.

Získaný produkt bol vyzrážaný, skrátený s *AcsI* a *NotI* reštrikčnými enzýmami a rafinovaný na géle. Fragment bol klonovaný na modifikovaný pNEB193, pAN (*PmeI* miesto bolo zmenené na *NotII* miesto), ktorý bol otvorený s *AcsI* a *NotI*, zreagovaný so Shrimp alkalickou fosfatázou a po inaktivácii enzýmov teplom bol rafinovaný na géle. Štyri zo získaných klonov boli sekvenované, aby sa overilo, že nesú UTR56 sekvenciu.

Promótorová oblasť bola amplifikovaná s použitím bnr5 (SEQ.ID:29:) ako 5'-priméru a ako 3'-priméry boli použité RbSiB (SEQ.ID:20:) a RBNCO (SEQ.ID:21:) (viď vyššie). Podmienky PCR boli podobné tým, ktoré boli použité pre amplifikáciu celého génu a boli takto modifikované: 5 ng / µl plazmidu DNA nesúceho klony (linearizované s *AscI*) bolo použité ako templáty, uskutočnených bolo len 10 cyklov.

Príklad 3

Porovnanie rôznych konštitutívnych a indukovateľných promótorov pre nadmernú expresiu transgénu (GUS) v tabaku a *Brassica campestris*

Klíčiace sadenice boli zmrazené kvapalným dusíkom a rozomleté. Proteíny boli extrahované fosfát-EDTA pufrom. Vzorky boli centrifugované a supernatanty boli analyzované s použitím sady na detekciu aktivity β -glukuronidázy (Sigma). Koncentrácia proteínu bola analyzovaná pomocou "Protein assay reagent (Biorad)" s použitím BSA ako štandardu.

Tabuľka 3

Špecifické aktivity GUS s rôznymi konštitutívnymi a indukovateľnými promótormi v tabaku a *Brassica campestris*

Rastlina	Promótor	Špecifická aktivita (nmol MU/min/mg rozpustného proteínu)
Tabak	<i>B. Rubisco</i> typ I	7
<i>B. campestris</i>	Tepelný šok	44
<i>B. campestris</i>	Amyláza tepelného šoku	5
<i>B. campestris</i>	35S	28

Pri sledovaní aktivity promótoru v klíčiacom semene počas klíčenia v sériách siedmich dní bol zaznamenaný exponenciálny vzrast špecifickej aktivity napríklad u Rubisco promótoru. Špecifická aktivita Rubisco promótoru bola 0,25 na štvrtý deň, 0, 5 na piaty deň, 1,6 na šiesty deň a 7 na siedmy deň.

Analýza inhibítorov vývoja chloroplastu pre Rubisco proteín a úrovni mRNA v klíčiacich semenách

Analýzy klíčiacich prirodzených sadeníc *B. campestris* ukázali, že proteín Rubisco malej subjednotky dosahuje najvyššie koncentrácie tri dni po ini-

ciácii klíčenia a Rubisco malá podjednotka mRNA o deň skôr. Zistili sme, že pridaním streptomycínu, 100 mg / l do živného média 48 hodín po iniciácii klíčenia, je možné potlačiť syntézu Rubisco proteínu, avšak úroveň mRNA zostáva konštantná. Pretože Rubisco proteín je hlavným proteínom v určitých typoch klíčiach kotyledónov je prospešné jeho syntézu potlačiť. Semená bola klíčené v prevzdušňovanej vode doplnenej o streptomycín. Vzorky boli zhromažďované v 12 hodinových intervaloch. Hladiny proteínov boli analyzované z SDS-PAGE gélu a úrovne mRNA boli analyzované RNA „dot blot“ analýzou.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Spôsob založený na princípe zdroja a spotrebiča na konverziu zásobných rezerv v transgénnych semenách na zmes zahrnujúcu jeden alebo viac žiaducich génových produktov, produkovaných *de novo* syntézou počas klíčenia, ktoré klíčenie je zastavené pred poklesom uvedenej *de novo* syntézy, a ktorá zmes je získaná s použitím alebo bez nadväzujúceho spracovania, vyznačujúci sa tým, že požadovaným génovým produktom je heterológny proteín, pričom sa
 - (a) kultivuje transgénna dvojkľúčna rastlina majúca počas klíčenia vyvolateľný expresívny systém, aby bol zaistený uložitelný vnútorný zdroj východiskového materiálu, ktorý môže byť zberaný ako transgénne dvojkľúčne semená, kde uvedený vyvolateľný expresívny systém zahŕňa regulačné sekvencie, vybrané z regulačných sekvencií poskytujúcich vysoké úrovne expresie v kotyledónoch klíčiacych semien;
 - (b) uvedené transgénne dvojkľúčne semená zahrnujúce jeden alebo viac expresívnych systémov integrovaných do genómu rastliny sa uvedú do styku s okolitým médiom, aby vzklíčili, počas ktorého klíčenia je mobilizovaný vnútorný zdroj východiskového materiálu a expresívny systém je uvedený do činnosti;
 - (c) expresívny systém integrovaný v rastlinnom genóme sa použije pre *de novo* syntézu jedného alebo viac požadovaných heterológnych proteínov z vnútorného zdroja východiskového materiálu mobilizovaného v kroku (b), aby poskytol zmes zahrnujúcu klíčiace dvojkľúčne semená alebo sadenice.
2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že vyvolateľný expresívny systém zahŕňa promótor poskytujúci vysoké úrovne expresie a *de novo*

syntézy heterológnych proteínov v kotyledónoch klíčiach dvojklíčnych semien.

3. Spôsob podľa nároku 1 alebo 2, vyznačujúci sa tým, že promótorom je promótor génu kódujúceho Rubisco proteín.
4. Spôsob založený na princípe zdroja a spotrebiča na konverziu zásobných rezerv v transgénnych semenách na zmes zahrnujúcu jeden alebo viac žiaducich génových produktov, produkovaných *de novo* syntézou počas klíčenia, ktoré klíčenie je zastavené pred poklesom uvedenej *de novo* syntézy a ktorá zmes je získaná s použitím alebo bez nadväzujúceho spracovania, vyznačujúci sa tým, že požadovanými génovými produktmi sú heterológne proteíny, pričom sa
 - (a) kultivuje transgénna dvojklíčna rastlina majúca počas klíčenia vyvolateľný expresívny systém, aby bol zaistený uložitelný vnútorný zdroj východiskového materiálu, ktorý môže byť zberaný ako transgénne dvojklíčne semená, kde uvedený vyvolateľný expresívny systém zahrnuje regulačné sekvencie, vybrané z regulačných sekvencií poskytujúcich vysoké úrovne expresie v kotyledónoch klíčiach semien;
 - (b) uvedené transgénne dvojklíčne semená, zahrnujúce jeden alebo viac expresívnych systémov integrovaných do genómu rastliny, sa uvedú do styku s okolitým médiom, aby klíčili, počas ktorého klíčenia je mobilizovaný vnútorný zdroj východiskového materiálu a expresívny systém je uvedený do činnosti;
 - (c) transgénny expresívny systém integrovaný v rastlinnom genóme sa použije pre *de novo* syntézu jedného alebo viac požadovaných heterológnych proteínových produktov z vnútorného zdroja východiskového materiálu mobilizovaného v kroku (b), aby poskytol

zmes zahrnujúcu klíčiace dvojklíčne semená alebo sadenice, kedy využitie pre *de novo* syntézu je zaistované riadením znižovania expresie endogénneho génu ponechaním viac voľných aminokyselín pre transgénnu expresiu v klíčiacich semenách alebo sadeniciach dvojklíčnych rastlín.

5. Spôsob podľa nároku 4, **vyznačujúci sa tým, že** riadené znižovanie génu je uskutočňované potlačením alebo antisense technológiami.
6. Spôsob podľa nároku 4 alebo 5, **vyznačujúci sa tým, že** riadene znižovaný gén kóduje Rubisco proteín.
7. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 6, **vyznačujúci sa tým, že** zmes zahrnujúca najmenej jeden heterológny proteín je uvedená do styku so substrátom zahrnujúcim najmenej jednu zlúčeninu, ktorá môže byť transformovaná biochemickou reakciou katalyzovanou jedným alebo viacerými uvedenými heterológnymi proteínmi.
8. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 7, **vyznačujúci sa tým, že** zmes zahrnujúca najmenej jeden heterológny proteín je uvedená do styku s reagentom zahrnujúcim najmenej jednu zlúčeninu schopnú modifikovať jeden alebo viac heterológnych proteínov.
9. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 8, **vyznačujúci sa tým, že** zdroj východiskového materiálu zahrnujúci transgénne dvojklíčne semeno je prípadne sterilizovaný a klíčenie sa deje v podstate v sterilných podmienkach zaistujúcich v podstate sterilný produkčný systém zdroj-spotrebič.

10. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 9, **vyznačujúci sa tým**, že promotor je v podstate nečinný alebo môže byť utlmený, keď je transgénna rastlina pestovaná v poľných podmienkach.
11. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 10, **vyznačujúci sa tým**, že okolité médium je prípadne pufrovaný vodný roztok.
12. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 11, **vyznačujúci sa tým**, že produkčný systém zdroj-spotrebič je doplnený o najmenej jeden fyzikálny alebo chemický prostriedok na vyvolanie klíčenia.
13. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 12, **vyznačujúci sa tým**, že produkčný systém zdroj-spotrebič je doplnený o najmenej jeden vonkajší živinový prostriedok.
14. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 13, **vyznačujúci sa tým**, že produkčný systém zdroj-spotrebič je doplnený o najmenej jeden prostriedok regulujúci zvýšenie *de novo* syntézy žiadaného/žiadanych heterológneho/heterológnych proteínu/proteínov.
15. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 14, **vyznačujúci sa tým**, že produkčný systém zdroj-spotrebič je doplnený o najmenej jeden prostriedok regulujúci zníženie *de novo* syntézy endogénneho/endogénnych génového/génových produktu/produktov produkovaného/produkovaných normálne počas klíčenia.

16. Spôsob podľa niektorého z nárokov 1 až 15, **vyznačujúci sa tým, že** klí-
čenie je prípadne zastavené najmenej jedným prostriedkom, zahrnujúcim
zahrievanie, sušenie, drvenie, separovanie, extrahovanie, lisovanie a fil-
trovanie a následným opätovným získaním pomocou alebo bez nadväzu-
júcich metód spracovania najmenej jedného z heterológnych proteínov.
17. Zo semien pochádzajúca zmes získateľná z dvojkličných semien, **vyzna-
čujúca sa tým, že** zmes je v podstate kontaminantu prostou zmesou ob-
sahujúcou jeden alebo viac heterológnych proteínov syntetizovaných v
kotyledónoch dvojkličného semena alebo sadenice.
18. Zo semien pochádzajúca zmes podľa nároku 17, **vyznačujúca sa tým, že**
zmes obsahuje ďalej okolité médium.
19. Zo semien pochádzajúca zmes podľa niektorého z nárokov 17 až 18, **vy-
značujúca sa tým, že** zmes zahrnuje ďalej substrát alebo reagent obsa-
hujúci aspoň jednu zlúčeninu, ktorá môže byť uvedenou zmesou trans-
formovaná, alebo ktorá môže modifikovať jeden z heterológnych protei-
nov v uvedenej zmesi.
20. Zo semien pochádzajúca zmes podľa niektorého z nárokov 17 až 19, **vy-
značujúca sa tým, že** zmes je poskytovaná v sušenej alebo nadväzujúcim
spôsobom spracovanej forme.
21. Zo semien pochádzajúca zmes podľa niektorého z nárokov 17 až 20, **vy-
značujúca sa tým, že** zmes obsahuje ďalej jednu alebo viac vhodných
ingrediencií pre formuláciu.

22. Expresívny systém použiteľný v postupe podľa niektorého z nárokov 1 až 16, **vyznačujúci sa tým, že expresívny systém obsahuje jednu alebo viac regulačných sekvencií získateľných z regulačných sekvencií zaistujúcich v kotyledónoch klíčiach dvojkličných semien vysoké úrovne expresie.**
23. Spôsob selekcie regulačných sekvencií vhodných na konštrukciu expresívneho systému podľa nároku 22, **vyznačujúci sa tým, že sa**
- a) izoluje celková RNA z kotyledónov a listov dvojkličných rastlín;
 - b) pripraví sa cDNA reverznou transkripciou amplifikovaním uvedenej RNA s jedným mRNA špecifickým primérom a primérom špecifickým pre proteín, ktorý je v kotyledónoch dvojkličných semien exprimovaný vo vysokej úrovni;
 - c) zhromaždia sa klony zahrnujúce cDNA a nanesú na platne;
 - d) porovnajú sa výsledky s klonmi získanými z RNA pochádzajúcej z listov a
 - e) získajú sa klony zahrnujúce cDNA vykazujúcu zvýšenú aktivitu v klíčiach dvojkličných semenách.

Anotácia

Názov vynálezu: Spôsob konverzie zásobných rezerv semien dvojklíčnych rastlín na zmesi obsahujúce jeden alebo viac génových produktov

^{je opísaný} Predkladaný vynález sa týka spôsobu produkcie ^{génových} produktov, o ktoré je záujem, založeného na princípe zdroj-spotrebič ^{zdrojových rezerv} z ^{rastlín} drvených alebo nedrvených klíčiacich ^{semien} dvojklíčnych obsahujúcich expresívny systém, ktorý je iniciovaný alebo môže byť iniciovaný počas klíčenia. Produktom je zo semena pochádzajúca zmes obsahujúca jeden alebo viac génových produktov. Alternatívne sa ^{získava} získa produkt, o ktorý je záujem, ^{skondenzáciou} uvedením zmesi do styku so substrátom obsahujúcim substanciu schopnú transformácie zo semena pochádzajúcou zmesou ako takou, v sušenej alebo nadväzujúcim spôsobom spracovanej forme.

ZOZNAM SEKVENCII

<110> UniCrop Ltd

<120> Spôsob konverzie zásobných rezerv semien dvojkľíčných rastlín na zmesi obsahujúce jeden alebo viac génových produktov

<130> 9H08PC-

<140>

<141>

<150> FI 19992659

<151> 1999-12-10

<150> PCT/FI00/01081

<151> 2000-12-08

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 1

ttttttttt tca

13

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 2

ttttttttt tct

13

<210> 3
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: -

<220>
 <223> 3' primér

<400> 3
 ttttttttt tcc 13

<210> 4
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: -

<220>
 <223> 3' primér

<400> 4
 ttttttttt tcg 13

<210> 5
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: -

<220>
 <223> 3' primér

<400> 5
 ttttttttt tga 13

<210> 6
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 6

ttttttttt tgt

13

<210> 7

<211> 13

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 7

ttttttttt tgc

13

<210> 8

<211> 13

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 8

ttttttttt tgg

13

<210> 9

<211> 13

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 9

ttttttttt taa

13

<210> 10

<211> 13

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 10

ttttttttt tat

13

<210> 11

<211> 13

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 11

ttttttttt tac

13

<210> 12

<211> 13

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 3' primér

<400> 12

ttttttttt tag

13

<210> 13

<211> 49

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> 5' primér

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<400> 13
cgcggatccc acgggtttgt ttaccgtgag cacggaagca cccccggat 49

<210> 14
<211> 49
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>
<223> 3' primér na klonovanie klonu rbc cDNA

<400> 14
aaggaaaaa gcggccgcaa ttttttttt ttttttttt ttttttgc 49

<210> 15
<211> 150
<212> DNA
<213> Brassica campestris

<220>
<223> utr2-sekvencia

<400> 15
ttcgcgttgt aagacatttc ataaataata tctacctcat ttcatttcca ttgtctgtt 60
ttctttggct tttgtttct gaggcattgt atatcggatt gtcaagtgtc tgatttatga 120
acaacatgta atctctatat gcatatttct 150

<210> 16
<211> 139
<212> DNA
<213> Brassica campestris

<220>
<223> utr8-sekvencia

<400> 16
ttcgctttca tataataata tcttctcat ttcatttcca ataagtctgt ttcttttttc 60
tctttggatt tctgttacga gactttctat atcggattgt aaaatgtctg attttatgaa 120
catgtaattt cggcaaata 139

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> bnrbl

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: -

<400> 17
gaattctaac gacccttttc cg 22

<210> 18
<211> 34
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> UTR2

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: -

<400> 18
ggccacactt gacaatccga tataacatgc ctca 34

<210> 19
<211> 38
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> bnrbl3

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: -

<400> 19
aaaaagcttc tagacccttt tccgtcataa gttttata 38

<210> 20
<211> 36
<212> DNA
<213> Umelá sekvencia

<220>
<223> RbSiB

<220>
<223> Opis umelej sekvencie: -

<400> 20
caggctctccc atgcagctaa ctcttctctcc gttgct 36

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> RBNCO

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: -

<400> 21
 gaggaagcca tggctacttc tt 22

<210> 22
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: -

<220>
 <223> Oligo T primér

<400> 22
 cacacacagc ggccgctttt ttttttttt ttttttttt tvn 43

<210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Umelá sekvencia

<220>
 <223> Opis umelej sekvencie: -

<220>
 <223> Koniec posledného exónu malej podjednotky rubisco

<400> 23
 cacacacatc gacgatcatc ggattcgaca 30

<210> 24
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> Brassica campestris

<220>
 <223> Typ I

<400> 24

ttaattcgcg ttgtaagaca ttccataaat aatatctact catttcattt ccatttgct 60
gtttctttg gctttttgtt tctgaggcat gttatatcgg attgtcaagt gtctgattta 120
tgaacatgta atctctatat tgcataatctt ctctctggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180

<210> 25

<211> 180

<212> DNA

<213> Brassica campestris

<220>

<223> Typ II

<400> 25

ttaatttgct atgacattca cataataatc tctgctcatt tcatttccaa ttgtctgttt 60
ctttccctt tggttttctg ttctcagac attctatatc ggattgtcaa atgtgtgatt 120
gtgaacatgt aatctctata ttgcttcttc gtcttggtta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 180

<210> 26

<211> 176

<212> DNA

<213> Brassica campestris

<220>

<223> Typ III

<400> 26

ttaattcgct ttcataaat aatatctctt catttcattt ccaataagtc tgtttctttt 60
ttctctttg gatttctgtt acgagacttt ctatatcgga ttgtaaaatg tctgatttta 120
tgaacatgta atttctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 176

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> bnr4

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<400> 27

ggccatgaat tctaacgacc cttttccgtc ataaaagt 38

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<220>

<223> 56r6

<400> 28

cgcgatatag aaattacatg ttcataaaat cagacatttt ac

42

<210> 29

<211> 48

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> bnr5

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

<400> 29

gaggtacccg cggccgcgaa ttctaacgac cctttccgt cataaaag

48

<210> 30

<211> 46

<212> DNA

<213> Umelá sekvencia

<220>

<223> 56r7

<220>

<223> Opis umelej sekvencie: -

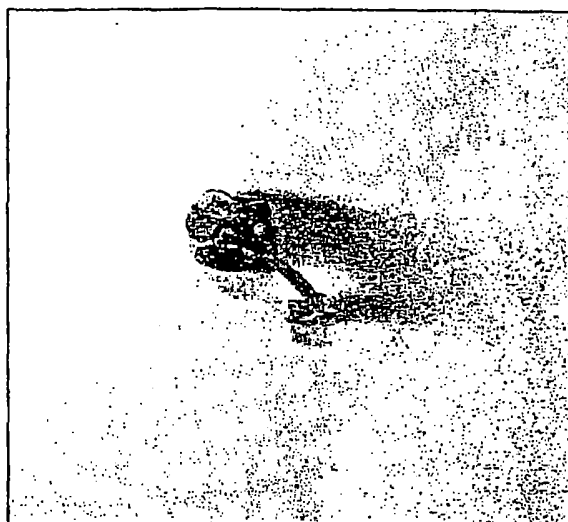
<400> 30

gagaattcgg cgcgcatag aaattacatg ttcataaaat cagaca

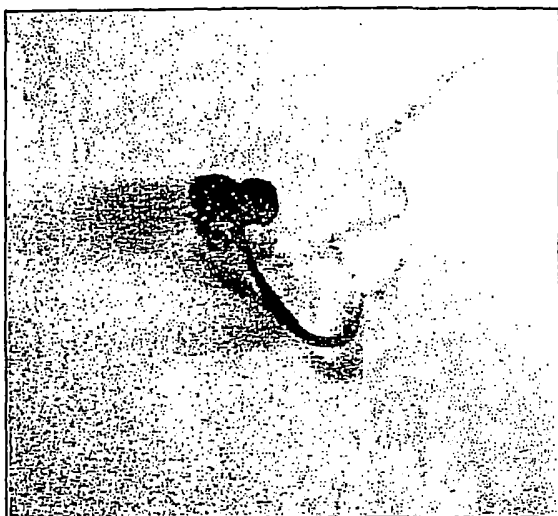
46



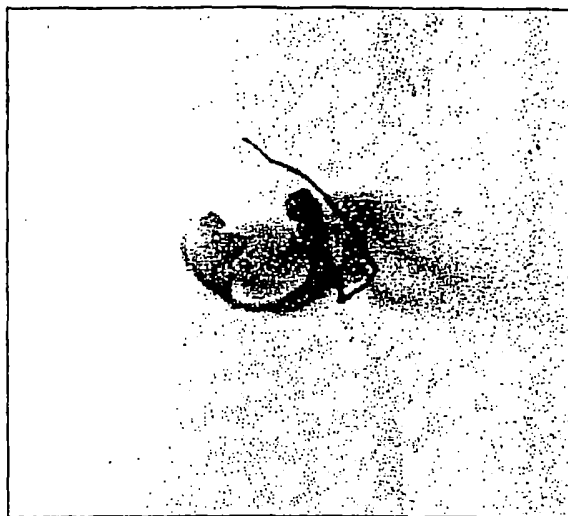
OBRÁZOK 1A



OBRÁZOK 1B

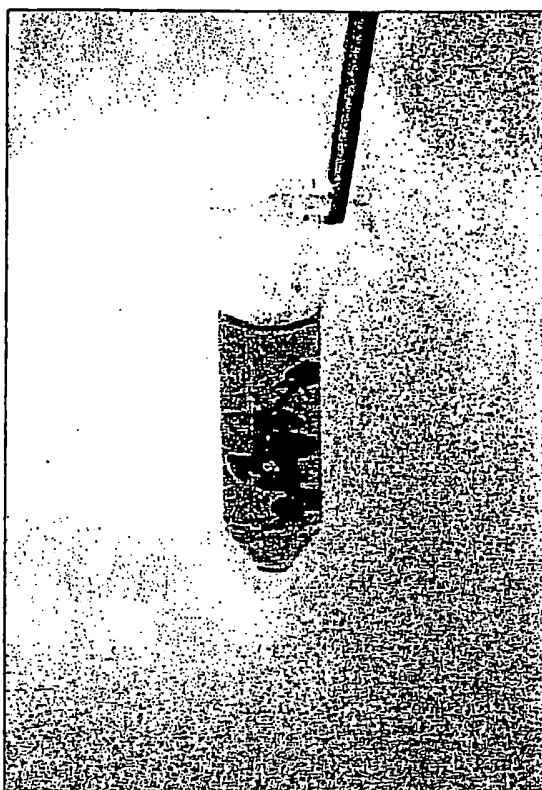


OBRÁZOK 1C



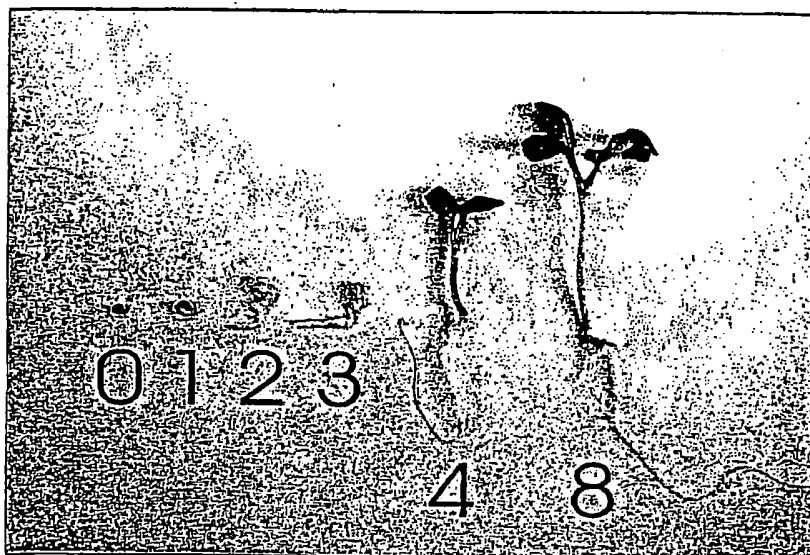
OBRÁZOK 1D

OBRÁZOK 1

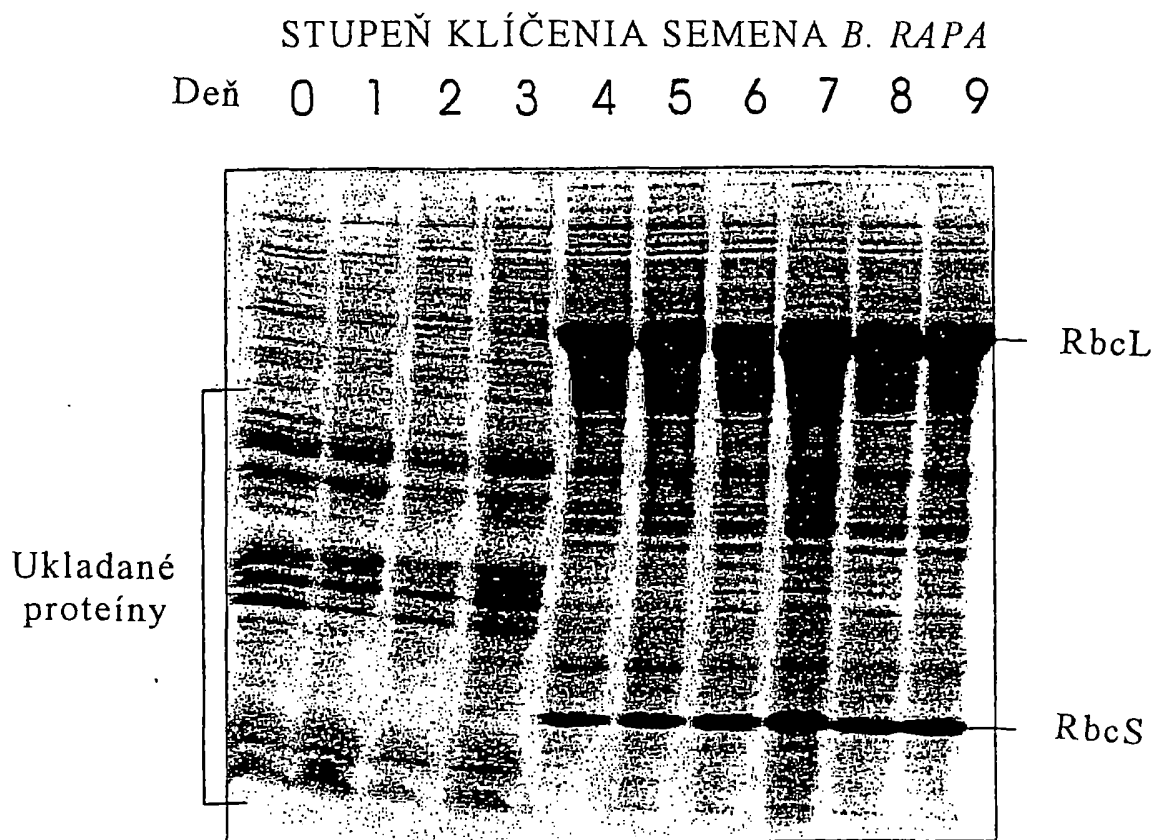


OBRÁZOK 2

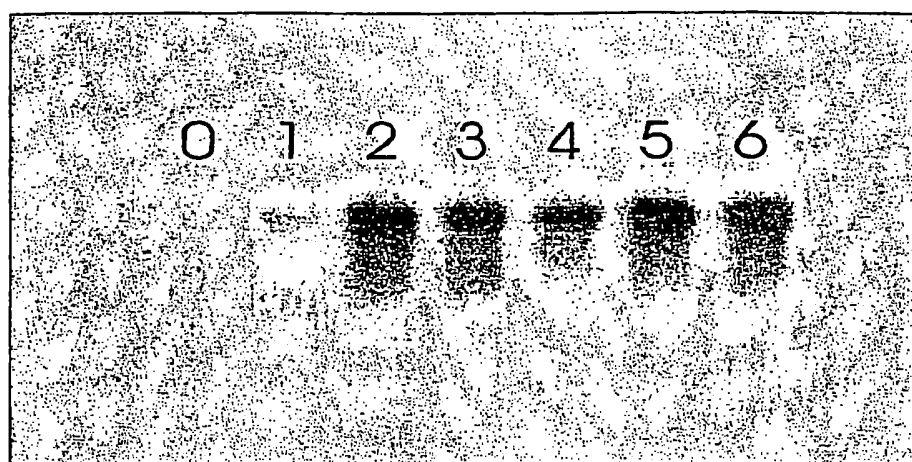
STUPEŇ KLÍČENIA SEMENA *B. RAPA*



OBRÁZOK 3



OBRÁZOK 4



OBRÁZOK 5