

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22.01.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.12.2000 29.12.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/751687 2000/IB0002045**

(33) Země priority: **US WO**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003**
(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/IB01/00207**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/053721**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 1872

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 9/02

C 12 N 15/82

A 01 H 5/10

(71) Přihlašovatel:

CARLSBERG RESEARCH LABORATORY,
Copenhagen, DK;
HEINEKEN TECHNICAL SERVICES BV,
Zoeterwoude, NL;
BRASSERIES KRONENBOURG, Strasbourg, FR;

(72) Původce:

Douma Anneke Christiana, Zeist, NL;
Doderer Albert, Zoeterwoude, NL;
Cameron-Mills Varena, Valby, DK;
Skadhauge Birgitte, Birkerød, DK;
Bech Lene Molskov, Smorum, DK;
Schmitt Nathalie, Den Haag, NL;
Heistek Jolanda Carolina, Vlaardingen, NL;
Van Mechelen Johannes Reinier, Amsterdam, NL;

(74) Zástupce:

Reichel Pavel Ing., Lopatecká 14, Praha 4, 14700;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Ječmen s nízkou aktivitou lipoxygenázy-1

(57) Anotace:

Jsou poskytovány rostliny ječmene, které vykazují sníženou aktivitu enzymu lipoxygenáza-1, například rostliny ječmene exprimující mutantní protein LOX-1. Rostliny ječmene jsou užitečné při výrobě rostlinných produktů, jako jsou slad a vařené nápoje, zvláště pivo, které vykazují zvýšenou stabilitu a snížený potenciál T2N.

Ječmen s nízkou aktivitou lipoxygenázy-1

Tato patentová přihláška byla podána jako PCT mezinárodní patentová přihláška jménem Carlsberg Reasearch Laboratory, dánské společnosti, dne 22. ledna 2001, a je určena pro všechny země.

Oblast techniky

Tento vynález spočívá v oblasti biotechnologie rostlin. Podrobněji se tento vynález týká mutantního genu lipoxygenázy-1 ječmene (lox-1), který kóduje enzym se silně sníženou aktivitou tvorby 9-hydroperoxyoktadekanové kyseliny. Tento vynález se také týká použití kultivarů ječmene, homozygotních pokud jde o lox-1, při způsobech vaření pro snížení tvorby nestandardních vůní v produktech vaření, jako je pivo, během skladování.

Dosavadní stav techniky

Lipoxygenázy jsou rodinou enzymů (EC 1.13.11.12), které katalyzují dioxidaci volných a esterifikovaných poly-nenasycených mastných kyselin vykazujících 1(Z),4(Z)-penta-dienovou konfiguraci. Produkty lipoxygenázou katalyzovaných reakcí byly dlouho podezřívány, že jsou hlavním viníkem pro výskyt vůně zatuchliny v rostlinných zrnech/semenech a v potravinářských výrobcích odvozených ze zrn/semenech (Robinson a kol., Food Chem., 54, 33 až 43 (1995)). Lipoxygenázy jsou zapojeny do tvorby těkavých hexanalových aldehydů tvořících se během zpracování sojových bobů, které mají nežádoucí vůni a tak omezují použití proteinů ze sojových bobů v potravinářských výrobcích. Věří se, že tři isozymy lipoxygenázy exprimované v sojových bobech přispívají k oxidaci lipidů a

tvorbě hexanalů. Mutanty soji postrádající jeden nebo více z těchto izozymů byly vytvořeny s cílem snížit tvorbu hexanalů a zlepšení stability aroma sojových bobů. Úspěch tohoto přístupu ocenil Hildebrand a kol., J. Agric. Food Chem., 38, 1934 až 1936 (1990). Mutanty postrádající lipoxygenázu-3 soji produkovaly vyšší hladiny hexanalů, což naznačuje, že tento izozym převádí 13-hydroxyperoxyoktadekanoidy, vytvářené oxidací lipidů na netěkavé produkty. Oblast funkční charakteristiky třínuclových linií soji, postrádajících v semeni všechny tři lipoxygenázy, ukazuje, že tyto enzymy nejsou podstatné pro agronomické a normální charakteristické vlastnosti semen (Narvel a kol., Corp Sci., 38, 926 až 928 (1998)).

Lipoxygenázy mají také být zapojeny při tvorbě nestandardních vůní rýže, které se mohou vyskytovat během skladování zrna. V skladovaném zrní může být zjištěno uvolňování volných mastných kyselin, které je průkazem látkové přeměny zásob triglyceridů. Bylo zjištěno, že odrůda rýže Daw Dam hromadí nižší hladiny pentanalů a hexanalů, což poskytuje lepší stabilitu chuti a aroma při skladování (Susuki a kol., J. Agric. Food Chem., 47, 1119 až 1124 (1999)). Tento žádoucí fenotyp byl připisován absenci lipoxygenázy-3 rýže, která oxiduje nenasycené acylové řetězce lipidů za tvorby 9-hydroxyperoxyoktadekanových polohových isomerů.

Uznává se, že způsob činnosti lipoxygenázy je komplexem s mnoha variacemi a jeho úloha v četných aspektech růstu rostliny a fyziologii není plně pochopena. Modifikace způsobu působení lipoxygenázy, které mění účinnost 9-hydroperoxidace ve sklizených semenech, jsou navrhovány pro regulaci jejich náchylnosti ke mykotoxinové kontaminaci, kterou způsobuje *Aspergillus* spp. (WO 97/26 364), a které jsou v souladu se

zapojením tohoto způsobu do patogenní resistance rostliny, ale nevztahují se k cílům tohoto vynálezu zde popsaným.

Mezi mnoha těkavými složkami aroma, které přispívají k vůni piva, vyšší nenasycené aldehydy s řetězcí o 6 až 12 atomech uhlíku vykazují zvláště nízké organoleptické prahy vůně (Meilgaard, MBAA Tech. Quart., 12, 151 až 168 (1975)). Trans-2-nonenal, který je členem této skupiny, vykazuje jak extrémně nízký práh vůně o hodnotě 0,11 dílů na miliardu (0,11 ppb), tak vnáší do piva nepříjemnou jakoby slámovou, „lepenkovou“ vůni. Tato nestandardní charakteristická vůně způsobovaná trans-2-nonenalem je běžnou charakteristickou vlastností piv skladovaných po 1 až 3 měsíce nebo déle a je zvláště škodlivá pro vůni ležáku, který je vařen s lehkými slady a má jemnou vůni.

O sulfitu je dlouho známo, že zlepšuje stabilitu vůně piva, nejen vázáním kyslíku a působením jako antioxidant, ale také pomocí tvorby těkavých adičních sloučenin bisulfitu s aldehydy a ketony přítomnými v pivu. Dvěmi hlavními zdroji sulfitu v pivu jsou sulfit produkovaný kvasnicemi během fermentace prostřednictvím způsobu asimilace síry a sulfit přidávaný k pivu před jeho plněním do obalů. Podmínky fermentace, které zvyšují produkci a vylučování sulfitu kvasnicemi umožňují tvorbu produktů adice sulfit-karbonyl z karbonylů přítomných v mladině a zabraňují jejich další látkové přeměně kvasnicemi (Dufour, Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Lisabon, 209 až 216 (1991)). Tímto způsobem mohou být do piva převedeny karbonyly, jako je acetaldehyd a biacetyl. Schopnost sulfitu zabránit výskytu karbonylové sloučeniny trans-2-nonenalu během stárnutí piva byla demonstrována pomocí vaření piva s kmenem kvasnic blokováným při způsobu asimilace síry (Johannesen a kol., Proc. Eur. Brew. Conv. Congr., Nice,

655 až 662 (1999)). Po plnění do lahví bylo pivo vystaveno nucenému stárnutí skladováním při 37 °C po 7 dní, po kteréžto době byly zjištěny hladiny trans-2-nonenalu hodně nad mezní hodnotou zjistitelnosti chutí. Jestliže k pivu s nízkým obsahem sulfitu bylo přidáno 10 dílů na milion sulfitu bezprostředně před plněním do lahví, výskyt trans-2-nonenalu během nuceného stárnutí byl výrazně snížen. Reakce mezi sulfitem a karbonylovými sloučeninami je vratná a je termodynamicky a kineticky řízena. Zdánlivé rovnovážné konstanty pro bisulfitové sloučeniny se pohybují od $10^{-6}M$ pro karbonylové sloučeniny, jako jsou acetaldehyd, hexanal a dekanal, do $10^{-3}M$ pro biacetyl a pyruvát (Dufour, 1991, viz výše). Během skladování piva, výměna plynu přes obal umožní kyslíku proniknout do piva a tak se sulfit ztratí, takže slabší bisulfitové produkty adice budou disociovat, což umožňuje, aby se v pivu objevily volné karbonyly. Zatímco sulfit neodiskutovatelně zvyšuje chuťovou a aromatickou stabilitu piva, zvláště krátkodobě, jeho nahromadění v baleném pivu silně závisí na výměně plynu přes obal a teplotě. V hotovém pivu jsou hladiny sulfitu vytvořené během fermentace proměnné a přidavek sulfitu před stáčením do lahví není všeobecně přijatou praxí. Z těchto důvodů sulfit samotný neposkytuje spolehlivý způsob zvýšení dlouhodobé stability chuti a aroma piva za různých podmínek skladování piva používaných po celé zeměkouli.

Obecně je přijímáno, že trans-2-nonenal nalezený v pivě, pochází z oxidace polynenasycených mastných kyselin odvozených z lipidů zrna ječmene, kde 18-uhlíkový řetězec mastné kyseliny, linolové kyseliny [klasifikované jako 18,2n-6-poly-nenasycená mastná kyselina (Broun, Gettner a Sommerville, Annu. Rev. Nutr., 19, 197 až 216 (1999))] je nejhojnější. Avšak v literatuře je malá shoda pokud jde o mechanismus jímž je

trans-2-nonenal vytvářen. Byla navržena podoba enzymatických způsobů vedoucích k tvorbě trans-2-nonenalu z polynenasycených mastných kyselin, ale jednotlivé enzymatické kroky v zrně ječmene nebyly nikdy demonstrovány experimentálně nebo během procesu výroby sladu (Gardner, Adv. Cereal Sci. Technol., 9, 161 až 215 (1988)). Koncepce používání antimediatorové nebo ko-supresorové genové technologie pro snížení hladin lipoxygenázy-1 v zrně ječmene, a tudíž regulaci 9-hydroperoxidace a snížení hladin aldehydů a alkoholů v modifikovaném zrně ječmene, byla navržena jako prostředek pro regulaci tvorby nestandardních chutí a vůní, ale o výsledcích takového přístupu není podána zpráva (McElroy a Jacobsen, Bio/Technology, 13, 245 až 249 (1995)).

Zkouška nuceným stárnutím byla vyvinuta jako způsob pro hodnocení trans-2-nonenalového potenciálu piva, kde tvorba trans-2-nonenalu v mladině nebo pivu je vyvolána vystavením vzorků zvýšeným teplotám při sníženém pH (100 °C, při pH 4,0 po 2 hodiny). Pokusy korelovat trans-2-nonenalový potenciál v mladině a hotovém pivu s celkovou úrovní aktivity lipoxygenázy ve vysušeném sladu naznačují, že lipoxygenáza může přispívat k výskytu trans-2-nonenalu v uleželém pivu (Drost a kol., J. Am. Soc. Brew. Chem., 48, 124 až 131 (1990)). Závěry, které mohou být dedukovány z této studie, však jsou silně omezeny skutečností, že aktivita lipoxygenázy v ječmenném sladu je regulována v závěru procesu výroby sladu stupněm inaktivace enzymu během sušení na humně. Tudíž byl zkoumán pouze účinek aktivity zbytkové sladové lipoxygenázy na trans-2-nonenalový potenciál v odvozené mladině a hotovém pivu. Studie neuspěla při stanovení lipoxygenáz, které katalyzují první krok při enzymatickém způsobu působení lipoxygenázy v zrně ječmene během vývoje a výroby sladu, a jejich úlohy jako determinantu hladin trans-2-nonenalu

nalezených v pивě. Skutečně nepřítomnost kultivarů ječmene vykazujících deficitní obsah jednoho nebo více izozymů lipoxxygenáz činí nemožným poskytnout přesvědčivý důkaz pokud jde o úlohu způsobu působení lipoxxygenázy v ječmenném sladu při regulaci tvorby trans-2-nonenalu. Takové pokusy jsou potřebné pro zhodnocení příspěvku enzymatických způsobů, ve srovnání s autooxidačními/chemickými způsoby, k tvorbě trans-2-nonenalu v pивě. Proces vaření zahrnuje krok vaření mladiny za vysoké teploty, kde se předpokládá, že tyto neenzymatické reakce nastávají (Noël a kol., Agric. Food Chem., 47, 4323 až 4326 (1999)).

Podstata vynálezu

Tento vynález poskytuje kultivar ječmene vykazující značně sníženou aktivitu lipoxxygenázy-1. V jednom ztělesnění, rostliny ječmene podle tohoto vynálezu obsahují mutantní gen *lox-1* exprimující značně snížené hladiny izozymu lipoxxygenázy-1. V alternativním ztělesnění, rostliny ječmene obsahují heterologní sekvenci nukleové kyseliny exprimující antimediatorovou sekvenci do *lox-1* standardního typu, a tudíž snižující aktivitu enzymu.

Jak je zde naznačeno, slad a mladina vyrobená z ječmene podle tohoto vynálezu se sníženou hladinou aktivity lipoxxygenázy, například z kultivarů ječmene homozygotních pokud jde o mutantní gen *lox-1*, jsou užitečné pro výrobu piva s výrazně zesílenou stabilitou chuti a vůně a sníženými hladinami trans-2-nonenalu, zvláště za podmínek o kterých je známo, že podporují výskyt T2N. Tento vynález demonstruje vzájemný vztah mezi aktivitou lipoxxygenázy-1 z ječmeného sladu pro produkci 9-hydroxyperoxyoktadekadienových kyselin (9-

-HOPD), a přítomností trans-2-nonenalu v pivě. Tento vynález dále demonstruje, že použití ječmene homozygotního pokud jde o mutantní gen *lox-1* při procesech vaření zlepšuje stabilitu chuti a aroma piva, jak během skladování, tak při vystavení zvýšeným skladovacím teplotám. Tyto vlastnosti zvyšují kvalitu piva a jsou užitečné pro zvětšení jeho skladovací životnosti a snižují potřebu chlazení piva během dopravy a skladování.

Tento vynález poskytuje rostliny ječmene a jejich části, které vykazují sníženou aktivitu lipoxxygenázy-1, včetně rostlin ječmene exprimujících, jak je zde popsáno, mutantní protein LOX-1, stejně jako způsoby přípravy takových rostlin ječmene, částí rostlin, produktů z rostlin a zvláště sladu a pivních produktů vyrobených z rostlin ječmene podle tohoto vynálezu.

Popis obrazů na výkrese

Obr. 1 je graf zobrazující účinek inhibitorové nor-dihydroguajaretové kyseliny (NDGA) na imunoafinitu čištěné lipoxxygenázy 1 a 2 ze zárodků ze 3 dny klíčeného ječmenného zrna.

Obr. 2 je graf zobrazující hmotnost v čerstvém stavu vyvíjejícího se zrna linie G a kultivaru Vintage od 5 dní po květu do plné zralosti (FM). Každé stanovení je průměrná váha jednoho zrna ze 6-ti klasů.

Obr. 3 je graf zobrazující suchou hmotnost vyvíjejícího se zrna linie G a kultivaru Vintage od 5 dní po květu do plné zralosti (FM). Každé stanovení je průměrná váha jednoho zrna ze 3 vzorků po 5 zrnech.

Obr. 4 je graf zobrazující celkovou aktivitu lipoxygenázy ve vyvíjejícím se zrna linie G a kultivaru Vintage od 5 dní po květu do plné zralosti (FM).

Obr. 5 je graf zobrazující 9- a 13-HOPD produkty oxidace linolové kyseliny působením lipoxygenázy ve vyvíjejícím se zrna linie G.

Obr. 6 je graf zobrazující celkovou aktivitu lipoxygenázy v zárodcích z klíčícího zrna linie G a kultivaru Vintage vyjádřenou jako $\mu\text{mol}/\text{min}/10$ zárodků (jednotka/10 zárodků).

Obr. 7 je graf ukazující 9-HOPD a 13-HOPD produkty oxidace linolové kyseliny působením lipoxygenázy v zárodcích z klíčícího zrna linie G a kultivaru Vintage, zobrazující hladiny 9-HOPD a 13-HOPD.

Obr. 8 je Western blot zobrazení imunodetekce lipoxygenázy-1 v zárodcích vyvíjejícího se zrna linie G a kultivaru Vintage [standardní typ (wt)] od 5 dnů po květu do plné zralosti (FM).

Obr. 9 je Western blot zobrazení imunodetekce lipoxygenázy-1 v zárodcích ze zrna linie G a kultivaru Vintage [standardní typ] klíčených po dobu od 0 do 6 dní.

Obr. 10 je Northern blot zkoušený s 3'nepřepisovanou oblastí cDNA lox-1 a zobrazující přepisy lipoxygenázy-1 zjištěné ve vyvíjejícím zrna linie G a kultivaru Vintage [standardní typ] od 5 dní po květu do plné zralosti (FM).

Obr. 11 je Northern blot zkoušený s 3'nepřepisovanou oblastí cDNA lox-1 a zobrazující přepisy lipoxygenázy-1

zjištěné v zárodcích ze zrna linie G a kultivaru Vintage [standardní typ] klíčených po dobu od 0 do 6 dní.

Obr. 12A až 12G jsou seřazením nukleotidové sekvence promotorové a přepisované oblasti *lox-1* alely standardního typu kultivaru Vintage (WT) a alely linie G (LG). Výchozí místo přepisu (+1), výchozí kodon ATG (+69) a koncový kodon přepisu (+4231) jsou v genových sekvencích podtrženy. Nukleotidové mutace identifikované v alele linie G jsou zobrazeny v polotučných kurzívách a označeny hvězdičkou.

Obr. 13 je schematickou prezentací genu *lox-1* kultivaru Vintage (standardní typ) a mutantního genu *lox-1* linie G. Přepis od +1 do +4375 je složen ze 7 exonů (tečkované rámečky) a 6 intronů (bílé rámečky). Obě mutace v genu *lox-1* jsou označeny.

Obr. 14 je schematickým nákresem kazet genu pro dočasnou expresi cDNA *lox-1* standardního typu a genu *lox-1* a mutantního genu *lox-1* z linie G. Lipoxygenázu kódující sekvence jsou klonovány mezi konstitutivním kukuřičným ubichitinovým promotorem s intronem 1 (Ubi-1) a nos terminátorem.

Obr. 15 je histogram zobrazující aktivitu lipoxygenázy-1 v aleuronových protoplastech ječmene transfekovaných genovými kazetami obsahujícími standardní typ cDNA *lox-1*, mutantní gen *lox-1* z linie G, gen *lox-1* standardního typu (WT *lox-1*) a reporterový gen GUS kontrolního. Aktivita lipoxygenázy v extraktech z transfekovaných protoplastů je zkoušena na mikrotitračních plotnách pomocí oxidace jodidu draselného (KI) a kvantifikována spektrofotometricky. Aktivita lipoxygenázy-1 je vyjadřována jako jednotky na μg proteinu

v extraktu a je zobrazena jako průměr ze 3 měření ze dvou duplicitních zkoušek.

Obr. 16 je seřazením sekvence demonstrujícím, že polymorfie délky restriktů (RFLP) mezi standardním typem a mutantním genem *lox-1* odpovídá bodu mutace v nukleotidu 2347, vytvářejícím dodatečné restriční místo *AatII*.

Obr. 17 je schematickou prezentací PCR fragmentů *lox-1* amplifikovaných a odštěpených při reakci řetězce polymerázy - zkouška rozštěpením amplifikovaného polymorfního místa (PCR-CAPS). Pozice PCR primerů jsou označeny šipkami a *AatII* místa jsou uvedena nad genem (polohou sekvence). Exonové a intronové oblasti v PCR produktu jsou rozlišeny pomocí tečkovaných a bílých rámečků, a jsou uvedeny velikosti fragmentů z digerace *AatII*.

Obr. 18 je zobrazení pomocí elektroforetického agarózového gelu PCR fragmentů *lox-1* (652 párů bází), amplifikovaných při prvním kroku zkoušky PCR-CAPS, z genomické DNA linie G a kultivaru Vintage.

Obr. 19 je zobrazení pomocí elektroforetického agarózového gelu polymorfie délky restriktů (RFLP) zjištěné pomocí PCR-CAPS ve standardním typu a mutantním genu *lox-1*. Fragmenty z digerence *AatII* z mutantního genu zahrnují zvláštní restriční fragment o 313 párech bází, označený hvězdičkou.

Obr. 20 je tabulka zobrazující program zpětného křížení pro jednoduchou dvojici recesivního genu *ll* (nízká aktivita lipoxygenázy jako vlastnost) linie G s kultivarem Alexis. Genotyp *LL* jsou rostliny exprimující standardní typ aktivity lipoxygenázy (dominantní alela), genotyp *ll* jsou rostliny

exprimující nízkou aktivitu lipoxygenázy (recesivní alela). Ll jsou heterozygotní rostliny obsahující jak standardní, tak alelu s nízkou aktivitou lipoxygenázy. Jelikož vlastnost nízké aktivity lipoxygenázy je recesivní vlastností, Ll rostliny vykazují standardní typ aktivity lipoxygenázy. Po každém kole zpětného křížení (včetně samoopylení), je očekáváno, že potomstvo ll bude představovat 25 % potomstva. Pozorované četnosti nízké aktivity lipoxygenázy jsou měřeny. Vypočítaný procentický obsah genetického základu z kultivaru Alexis, který obsahuje homozygotní alelu s nízkou aktivitou lipoxygenázy je udáván jako % Alexis.

Obr. 21 je zobrazení detekce pomocí elektroforetického agarosového gelu mutantního genu *lox-1* v ll potomstvou z programu zpětného křížení linie G - Alexis. Zkouška PCR-CAPS na genomickou DNA z linie G (čára 2), kultivaru Vintage (čára 3), potomstva ll z 3. (čára 4) a 4. zpětného křížení (čáry 5 až 9). Žebřík čar DNA (DNA ladder) (čára 1). Kontrolní zpětně křížená linie s vysokým obsahem *lox* (čára 10).

Obr. 22A až 22B jsou komparativním seřazením sekvencí aminokyseliny sojových lipoxygenáz LOX-1 (Gm1), LOX-2 (Gm2), LOX-3 (Gm3) a lipoxygenáz ječmene LOX-1 (Hv1) a LOX-2 (Hv2).

Dále následuje podrobný popis vynálezu.

V souladu s předmětným vynálezem, jsou poskytovány rostlinné materiály, rostlinné produkty a způsoby pro výrobu nápojů, jako je pivo, nápojů, které mají snížený obsah sloučeniny s nestandardní vůní trans-2-nonenalu, takže stabilita vůně piva, např. piva během skladování a při vystavení zvýšeným teplotám je zlepšena, ve vztahu ke kontrolnímu nápoji. Podrobněji, tento vynález poskytuje druhy

ječmene, jejichž vyvíjející se a klíčící zrno produkuje značně snížené hladiny aktivity enzymu lipoxxygenáza-1, označovaného LOX-1, které, například když jsou používány při procesu vaření piva, mají za výsledek pivo, která má snížené hladiny trans-2-nonenalu, ve srovnání s kontrolní odrůdou ječmene.

Způsoby použité pro vytvoření, popis a schválení odrůdy ječmene, která má značně sníženou aktivitu LOX-1, a použití tohoto typu ječmene pro výrobu piva se stabilní vůní jsou popsány níže.

Dále následují definice.

Jak jsou používány zde následující termíny mají uvedené definice:

„Část rostliny“ znamená rostlinu nebo specifickou část rostliny, jako je stonek, listy, kořeny, květy, semena, zrna, plody nebo pupeny.

„LOX-1“ znamená protein lipoxxygenázy-1; „lox-1“ znamená gen kódující LOX-1.

Výraz „lox-1 mutantního ječmene“ znamená gen mutagenizovaného ječmene kódující mutantní polypeptid lipoxxygenázy-1.

„Nemutovaná(ý) kontrolní“ znamená rostlinu, nukleovou kyselinu, gen, polypeptid, část rostliny nebo rostlinný produkt obsahující standardní typ genu nebo proteinu.

„Heterologní“ znamená nenativní sekvenci, např. sekvenci odvozenou z jiných druhů nebo vytvořenou rekombinantně nebo syntetickou sekvenci, která se liší od nativní sekvence.

„Rostlinný produkt“ znamená produkt, který je výsledkem zpracování rostliny nebo části rostliny a zahrnuje, například slad a mladinu.

„Kyselá aminokyselina“ znamená aspartovou nebo glutamovou kyselinu.

„Bazická aminokyselina“ znamená histidin, lysin nebo arginin.

„Polární aminokyselina“ znamená threonin, serin, tyrosin, tryptofan, asparagin nebo glutamin.

„Organoleptické vlastnosti“ znamená vlastnosti apelující na smysly čichu a chuti, které jsou analyzovány, například zkušenskou skupinou degustátorů.

„Produkt získaný vařením“ znamená produkt připravený pomocí vystírání, vaření a kvašení např. pivo.

„Snížená hladina trans-2-nonenalu“ znamená méně než asi 50 % ve srovnání se stavu standardního typu (kontrolními).

2. Aktivita lipoxygenázy

Lipoxygenázové enzymy katalyzují oxidaci polynenasycených mastných kyselin. V ječmeni jsou známy izozymy LOX-1 a LOX-2. LOX-1 v první řadě katalyzuje 9-hydroperoxidaci, zatímco LOX-2 v první řadě katalyzuje 13-hydroperoxidaci polynenasycených

oktadekanových mastných kyselin. Údaje uvedené v příkladech níže demonstrují vztah mezi 9-hydroperoxidačním působením LOX-1 ječmene a přítomností trans-2-nonenalu v pивě. Podle toho, ječmen vykazující sníženou aktivitu LOX-1 je užitečný pro výrobu piva, které má sníženou hladinu trans-2-nonenalu a/nebo potenciál ve srovnání s kontrolním.

3. Tvorba ječmene s nízkou aktivitou lipoxxygenázy

Řada známých genetických přístupů může být použita k vytvoření rostlin podle tohoto vynálezu, což znamená k snížení úrovně aktivity enzymu lipoxxygenáza-1 exprimovaného v rostlině ječmene při stabilním, dědičném způsobu. Tyto přístupy zahrnují, ale nejsou omezeny na, antimediatorovou technologii a mutagenezi, jako je chemicky a ozářením způsobená mutagenese, stejně jako místně cílená mutagenese.

Transformace ječmene.

Ječmen může být přeměněn pomocí různých molekul nukleových kyselin zkonstruovaných pro ovlivňování exprese genu *lox-1* nebo změnu architektury genu *lox-1*. Různé způsoby, například přenos zprostředkovaný bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (Tingay a kol., Plant J., 11, 1369 až 1376 (1997)), bombardování částicemi (Wan a Lemaux, Plant Physiol., 104, 37 až 48(1994)), nebo polyethylenglykolem (PEG) - zprostředkované zvětšení DNA (Funatsuki a Kihara, Theor. Appl. Genet., 91, 707 až 712 (1995)) mohou být použity pro úspěšné zavedení nukleových kyselin do buněk ječmene, například do protoplastu, kalusu nebo zárodku.

K řízení exprese genu, který je předmětem zájmu mohou být použity různé promotory. Pro expresi vektorů obsahujících *lox-*

-1, včetně antimediatorových sekvencí, může být použita nativní promotorová oblast lox-1. Tato promotorová sekvence lox-1 je obsažena v nukleotidech 2602 až 3511, které obsahují 5'UTR z příspěvku EMBL č. U83904. Alternativně mohou být použity promotory, které konstitutivně řídí expresi genu, který je předmětem zájmu, například kukuřičného ubichitinového promotoru Ubi.1 (Wan a Lemaux, viz výše; Kjaerulff a kol., ve vydání od P. Mathias, *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, sv. II, 151 až 154 (1995)). Vektory exprese mohou také obsahovat oblast terminace transkripce, například 3'terminátor genu nopalínové syntázy (3'-nos) (Bevan a kol., *Nucl. Acids Res.*, 11, 369 až 385 (1983)) byl fúzován ke genům exprimovaným v transgenickém ječmeni (Wan a Lemaux, viz výše; Funatsuki a Kihara, viz výše).

Vektory exprese mohou také obsahovat gen, který umožňuje selekci transformovaných buněk tam, kde byl vektor úspěšně integrován do buňky. Tyto geny mohou kódovat geny resistance vůči antibiotikům a herbicidům, například gen neomycinové fosfotransferázy (npt) nebo gen fosfinothricin-acetylové transferázy (tyčkový). Když jsou exprimovány, takové geny resistance umožňují růst transformované buňky v jednom z prostředí obsahujícím buď neomycin nebo bialafos (viz například Wan a Lemaux, viz výše; Funatsuki a Kihara, viz výše; Kjaerulff a kol., ve vydání od P. Mathis, viz výše).

Po transformaci, mohou buňky být pěstovány v selektivním prostředí a potom mohou být kultivovány pro umožnění tvorby výhonků, následovaných kořenovým systémem a potom sazenicemi. Úspěšný postup transformace ječmene vyvinuli Funatsuki a Kihara (viz výše), kde transformace protoplastů ječmene pomocí PEG s neomycinovou fosfotransferázou obsahující vektory exprese a následující selekcí v neomycinu získaných plodících

roślin obsahujících transgen. Ukázalo se, že transgen je integrován do genomu a většina transgenických rostlin exprimovala protein kódovaný transgenem. Tyto transgenické rostliny byly také schopné přenášet a exprimovat transgen pocházející z křížení.

Rozumí se, že řada způsobů transformace, vektorů exprese, promotorů, sledovatelných značkovacích a podobných jsou známé a užitečné pro transformaci ječmene.

Mutageneze ječmene

Gen *lox-1* může být zaměřen na místně specifickou mutagenezi za použití oligonukleotidů chimérické RNA/DNA. Ukázalo se, že tyto oligonukleotidy chimérické RNA/DNA úspěšně zavádějí mutace do buněk rostliny (Zhu a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 8786 až 8773 (1999) a Beetham a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 8774 až 8778 (1999)) a buněk savců (Yoon a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., 93, 2071 až 2076 (1999)) v požadovaných polohách. Tyto oligonukleotidy chimérické RNA/DNA mohou být převedeny do protoplastů nebo buněk ječmene, které jsou předmětem zájmu, řadou způsobů, například za použití způsobů transformace zprostředkovaných PEG nebo bombardováním částicemi popsanými výše. Jednotlivé protoplasty nebo buňky mohou potom být znovu přenášeny pomocí tkáňové kultury do všech plodících rostlinách a jev mutace může být potvrzen a sledován, například za použití přístupu založeného na PCR, jak je podrobně vysvětleno v níže uvedených příkladech.

Tento způsob místně cílené mutageneze může být uplatněn pro mutování specifických zbytků v genu *lox-1*. Gen *lox-1* může být mutován v jedné nebo více pozicích nukleotidu

v promotorové oblasti pro snížení nebo zrušení transkripce *lox-1*. Specifická mutageneze může také být uplatněna pro vnesení změn do kódující oblasti *lox-1*, což například snižuje aktivitu enzymu. Takové mutace zahrnují, ale nejsou na ně omezeny, inserce, delece a substituce, které mají za výsledek posun, zkomolení proteinu LOX-1 a/nebo změnu neutrální nebo hydrofóbní povahy kavity substrátu enzymu.

Antimediátorová exprese

Redukce v expresi *lox-1* může také být doprovázena expresí antimediátorové struktury *lox-1* v buňkách ječmene. Způsoby pro expresi antimediátorové struktury v ječmeni pro snížení exprese cílového proteinu byly popsány, například v Gilpin M. J. a kol., ve: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, vydavatel G. Garab, sv. IV, 2983 až 2986 (1998); Kjaerulff a kol., ve: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, vydavatel P.Mathis, sv. II, 151 až 154 (1995).

Buňky ječmene mohou být transformovány pomocí struktury vytvořené expresí, která obsahuje antimediátorovou sekvenci nukleové kyseliny. Tato struktura vytvořená expresí produkuje molekulu antimediátorové RNA schopnou specifického vázání k při nejmenším části mediátorové RNA (mRNA) produkované ze standardního typu genu *lox-1*, prostřednictvím komplementárního párování báze a schopné přerušit sestřih prekurzorové-mRNA (pre-mRNA) nebo translaci této mRNA. Konstitutivní nebo tkáňový/dočasný specifický promotor, například promotor *lox-1* ječmene popsáný výše může řídit expresi sekvence antimediátorové nukleové kyseliny.

Chemická mutageneze

Chemický mutagen azid sodný (NaN_3) byl běžně používán pro mutagenезi ječmene a je o něm známo, že vyvolává stabilní mutace v DNA (deoxyribonukleová kyselina) sekvenci genomu ječmene (Olsen a kol., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90, 8043 až 8047 (1993)). Jiné chemické mutageny, například ethyl-methansulfonát (EMS), azidoglycerol (AG, 3-azido-1,2-propan-diol), methyl-nitrosomočovina (MNU) a hydrazid maleinové kyseliny (MH) mohou také být použity pro vyvolání mutací DNA (Rank J. a kol., Mutat. Res., 390, 121 až 127 (1997)), jaké může vyvolat ultrafialové záření.

Jak je ukázáno na příkladech uvedených dále, zrno kultivarů ječmene Vintage a Caruso bylo zpracováno s azidem sodným a množeno pomocí samoopylení až do 3. generace (M3).

4. Identifikace a selekce ječmene s nízkou aktivitou lipoxygenázy

Identifikace a selekce rostlin ječmene, které mají sníženou aktivitu isozymu lipoxygenázy v zrnu může být dosažena, například pomocí analýzy aktivity lipoxygenázy. Mohou být použity enzymatické zkoušky ke stanovení aktivity dvou hlavních lipoxygenáz, LOX-1 a LOX-2, o kterých je známo, že jsou přítomné buď v zralém nebo klíčícím zrnu,. Takové zkoušky by měly rozlišit aktivitu LOX-1 od aktivity LOX-2.

Jedna selektivní zkouška LOX-1 a LOX-2 je založena na oxidaci polynenasycené mastné kyseliny lipoxygenázou a spektrofotometrické detekci hydroperoxidového produktu z takové oxidace. Specifičnost této zkoušky pokud jde o LOX-1 využívá výhody komparativní necitlivosti LOX-1 na inhibitor, například NDGA, vztaženo k LOX-2.

Selektivní zkoušky může také být dosaženo využitím imunoprecipitace k selektivnímu odstranění LOX-1 nebo LOX-2 z látky podrobované zkoušce. Specifické protilátky anti-LOX-1 a anti-LOX-2, například monoklonální protilátky, mohou být připraveny z čištěné LOX-1 nebo LOX-2 jak popsal Holtman a kol., 1996, viz výše.

Tyto zkušební metody mohou být upraveny pro postupy zkoušek na mikrotitrových plotnách nebo pro jiné známé opakovatelné zkoušky vysoce výkonné povahy, které umožňují rychlé vyšetření mnoha vzorků. Tyto zkoušky mohou být schváleny pro vyšetření špiček listů klíčícího zrna v nedestruktivním způsobu tak, že sazenice vybrané při třídění mohou být dále rozmnožovány.

Úbytek aktivity LOX-1 v domnělých mutantech může být potvrzen zkouškou enzymatické aktivity. Například extrakt ze zrn může být inkubován s linolovou kyselinou a produkty oxidace linolové kyseliny analyzovány, například vysoko účinnou kapalinovou chromatografií s reverzními fázemi. Poměrná množství 9-HOPD a 13-HOPD vytvořená z linolové kyseliny poskytují měřítko aktivity LOX-1, jejímž hlavním produktem je 9-HOPD.

Jak je ukázáno v dále uvedených příkladech, přibližně 20 000 zrn z generace M3 mutagenizovaného kultivaru Vintage a kultivaru Caruso bylo vyšetřeno na aktivitu LOX-1 a LOX-2 oxidační zkouškou za přítomnosti inhibitoru a také imunoprecipitačními zkouškami. Použitím těchto zkušebních metod byl nalezen mutant v kultivaru Vintage, který má větší snížení aktivity LOX-1 a byl označen linie G. Fenotyp mutantu byl děděn v generacích M4 a M5.

Semena vyprodukovaná z ječmene linie G byla deponována 4. ledna 2001, v Národních sbírkách průmyslových, potravinářských a mořských bakterií (National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB)), 23 St. Machar Drive, Aberdeen, AB243RY, Skotsko, Spojené království, za podmínek Budapeštské Dohody, jako přírůstek číslo: NCIMB 41078.

5. Genetické sekvence

Přesný popis genotypické změny, která odpovídá fenotypu s nízkou aktivitou lipoxxygenázy v rostlinách ječmene podle tohoto vynálezu je užitečný pro identifikaci rostlin, které vykazují tuto genetickou změnu a pro nakřížení této genetické vlastnosti do jiných kultivarů ječmene v rámci pěstebního programu. Řada známých molekulárních a biochemických metod může být použita pro vymezení genetického základu pokud jde o fenotyp s nízkou aktivitou lipoxxygenázy.

Je obecně uznáváno, že jak cis-působící tak trans-působící genetické sekvence mohou vymezit expresi daného genu v genomu a aktivitu genového produktu. Kontrolní body při expresi genu zahrnují řízení časování, specifita tkáně a rychlost transkripce genu, stabilitu transkriptu a rychlost přenosu transkriptu. Jak úroveň exprese genu, tak stabilita a specifická aktivita kódovaného enzymu určí úroveň aktivity enzymu zjištěnou v tkáni.

Změny v sekvencích genu rostliny mohou být stanoveny pomocí sekvencování DNA podle známých relevantních částí genomu, zatímco analýza Northern poskytuje nástroj pro sledování stabilních úrovní transkripce v dané rostlinné tkáni. Enzym exprimovaný v tkáni rostliny může být vyhodnocen pomocí extrakce enzymu z tkáně a měřením enzymatické aktivity.

Jak je ukázáno dále v příkladech, identita genetických změn, které vymezují fenotyp s nízkou aktivitou lipoxygenázy mutantu linie G indukovaný v kultivaru Vintage byla určena následujícím způsobem. Strukturní gen kódující protein LOX-1, jak v mateřském kultivaru Vintage, tak v linii G, byl amplifikován pomocí reakce řetězce polymerázy (PCR) a promotorových sekvencí proti směru exprese genu, které řídí expresi genu, stejně jako byly sekvencovány vnitřní kódující sekvence obsahující intronové a exonové sekvence,.

Srovnání nukleotidových sekvencí genu *lox-1* z linie G a ze standardního typu kultivaru Vintage odhalilo 2 nukleotidové substituce ve 2 exonech, z kterých jeden (v poloze +2347) vede v exprimovaném proteinu k nekonzervativní substituci aminokyseliny (Glycin³⁶⁸ → Aspartát).

Obr. 22 zobrazuje seřazení ze sojových bobů (Gm: Glycin max. délka řetězce) lipoxygenáz LOX-1 (přirůstkové číslo P08170), LOX-2 (přirůstkové číslo P08170), LOX-3 (přirůstkové číslo AAB41272) a ječmene (hv: Hordeum vulgare), lipoxygenáz LOX-1 (přirůstkové číslo P29114) a LOX-2 (přirůstkové číslo AAB70865.1). Konzervované zbytky aminokyseliny a konzervativní substituce elektricky nabitých zbytků jsou zobrazeny polotučně. Přiřazení sekundární struktury sojové LOX-3 Glycin max., kde H = alfa helikasy a E = beta řetězce, jsou zobrazeny nad seřazením, a zbytky mající vztah k funkci enzymu (označené pomocí hvězdičky nebo plného kroužku) jsou zobrazeny, podle popisu v práci od Skzypczak-Jakun a kol., *Proteins*, 29, 15 až 31 (1997).

Zbytky aminokyseliny, které se účastní v nehemoglobinovém vázání železa nebo jsou nezbytné pro katalýzu (*) v LOX-3 sojových bobů zahrnují: H₅₁₈, H₅₂₃, H₇₀₉ [3 atomy dusíku]; N₇₁₃,

I857. Odpovídajícími zbytky v LOX-1 ječmene jsou H517, H522, H708, N712 a I862. Zbytky v LOX-3 sojových bobů s předpovídanou úlohou při katalýze (●) jsou: H266, H513, H776, F264, F272, F714, W519, R552, R726, D766, D779 a K278. Odpovídající zbytky v LOX-1 ječmene jsou: H261, H512, H775, F259, F267, F713, W518, R551, R725, D778 a K273.

Prolinové (P86, 109, 167, 171, 223, 234, 291, 311, 324, 343, 345, 371, 381, 382, 486, 541, 548, 600, 616, 627, 685, 726, 734, 788, 829, 833, 839, 857) a glycinové (G49, 67, 68, 70, 91, 107, 137, 187, 192, 210, 217, 218, 260, 306, 307, 336, 392, 409, 458, 474, 490, 569, 607, 674, 676, 720, 736, 783, 828, 850, 855) zbytky (+) umístěné v sekundárních strukturách proteinu ve smyčkách a v pozicích čepiček šroubovice, mohou usnadňovat ostré ohyby a svinutí hlavního řetězce peptidu.

Uspořádání lipoxxygenáz příbuzných rostlin naznačuje, že Glycin-368 v LOX-1 ječmene je silně konzervován. Mimoto tento zbytek, který odpovídá Glycinu-353 v LOX-1 soji, je jedním z 35 vysoce konzervovaných zbytků ze všech 58 zbytků, které vyplňují kavitu substrátu enzymu II, jak je vidět z jeho krystalické struktury. Tyto konzervované zbytky jsou ve středu pozornosti (rámečky) v uspořádání sekvencí rostlinné lipoxxygenázy zobrazeném na obr. 22 (Minor a kol., Biochemistry, 35, 10 687 až 10 701 (1996)), a zahrnují následující zbytky LOX-1 ječmene: Y224, L268, W355, E364, G368, V369, N370, I374, L424, L499, K501, A502, V504, D508, S509, H512, Q513, L514, H517, W518, H522, I556, L559, A560, L564, I565, I570, T574, S585, Q715, Y718, N724, R725, P726, T727, L772 a I862. Všechny až na 7 z 35 konzervovaných zbytků jsou neutrální nebo hydrofóbní zbytky. Substituce elektricky nabitých zbytků v pozici Glycin-368 v ječmeni nebo v jiném konzervovaném neutrálním nebo hydrofóbním zbytku vyplňujícím kavitu substrátu II, je pravděpodobně vhodná pro narušení strukturálních a funkčních

vlastností enzymu. Mutace G → D₃₆₈ v LOX-1 ječmene linie G (♦) je umístěna mezi alfa-šroubovicí H6 a beta-řetězcem E12.

Jak je zobrazeno v obr. 22, rodina lipoxygenázových enzymů sdílí vysoký stupeň konzervace sekvencí, která se odráží v jejich konzervované sekundární struktuře, stanovené pro několik členů rodiny rostlinných lipoxygenáz včetně LOX-1 a LOX-3 soji (Skrypczak-Jankun a kol., 1997, viz výše). LOX-1 ječmene sdílí 56,9% totožnost sekvencí a 67,8% podobnost sekvencí s LOX-3 soji. Několik zbytků aminokyseliny v isozymu LOX-3 soji bylo identifikováno jako ligandy pro nehemoglobinově vázané železo nebo se naznačuje, že jsou hlavní pro jeho aktivitu (označení *●). Z pohledu vysoké konzervace sekvence uprostřed LOX-1 ječmene a LOX-3 soji, je přiměřené předpovídat, že zbytky v sekvenci LOX-1 ječmene, které jsou homologní k těm sekvencím identifikovaným jako důležité pro funkci LOX-3, mohou být také podstatné pro enzymatickou aktivitu. Tudíž nekonzervativní substituce aminokyseliny v jakékoliv z těchto pozic, včetně substitucí těchto zbytků v LOX-1 ječmene odpovídajících 35 vysoce zakonzervovaným zbytkům z LOX-3 soji, které vyplňují kavitu substrátu, a v ostatních polohách podstatných pro aktivitu enzymu, pravděpodobně snižují aktivitu lipoxygenázy.

O zbytcích aminokyselin prolinu a glycinu je známo, že usnadňují ohýbání dovnitř hlavního řetězce peptidu, kde jsou umístěny mezi sekundárními strukturními elementy, které dovolují proteinu zaujmout svinutou terciární strukturu. Zbytky prolinu a glycinu jsou také běžné v motivech upravujících šroubovici čepičkou (Parker a Hefford, Protein Eng., 10, 487 až 496 (1997), <http://www.expasy.ch>). Jednoduchá nekonzervativní substituce v LOX-1 linie G, kde glycin umístěný mezi dvěma předvídanými strukturálními elementy byl

nahrazen aspartátem, vede k významnému úbytku aktivity enzymu. Tudíž se předpovídá, že mutace v genu LOX-1 způsobující nekonzervativní substituce aminokyselin v jednom nebo více zbytcích prolinu nebo glycinu v LOX-1 ječmene, položených v oblastech vně strukturálních elementů, mohou podobně zabraňovat svinutí přírodního proteinu a následovně snížení aktivity kódovaného enzymu.

Tudíž v jednom ztělesnění užitečný mutant rostliny ječmene podle tohoto vynálezu, který vykazuje sníženou aktivitu lipoxygenázy-1 obsahuje mutovanou sekvenci nukleové kyseliny, která mění neutrální nebo hydrofóbní povahu kavity substrátu enzymu vložím jedné nebo více kyselých, bazických nebo polárních aminokyselin. Například užitečná sekvence nukleové kyseliny [sekvence identifikační číslo: 11] kóduje protein LOX-1 ječmene [sekvence identifikační číslo: 12], který má substituci v aminokyselině 368 od Glycinu k Xaa, kde Xaa je kyselá, bazická nebo polární aminokyselina. Jednou specifickou sekvencí aminokyseliny LOX-1 mutantu ječmene podle tohoto vynálezu je ta, kde Xaa je aspartovou kyselinou, např. linie G.

Jak je ukázáno v příkladech uvedených níže, genotypické změny v linii G mají nezjistitelný vliv na expresi genu *lox-1*, ale aktivita LOX-1 zjištěná ve zralém a klíčícím zrnu linie G byla přibližně 9 % aktivity zjištěné v zrnu mateřské linie, kultivaru Vintage. Pro poskytnutí přímého důkazu, že mutace aminokyseliny v LOX-1 linie G je zodpovědná za fenotyp s nízkou aktivitou LOX-1, kódující sekvence *lox-1* linie G a *lox-1* kultivaru byly dočasně exprimovány v protoplastech z auleronu ječmene, a ukázalo se, že aktivita mutantního enzymu LOX-1 je silně snížena ve srovnání se standardním typem enzymu LOX-1.

6. Přenos mezi šlechtitelskými liniemi

Zjištění změn v genetickém charakteru rostlin ječmene genotypu podle tohoto vynálezu je užitečné pro identifikaci přítomnosti specifického genetického charakteru v linii ječmene, a pro usnadnění přenosu tohoto charakteru mezi šlechtitelskými liniemi při programu šlechtění. Řada molekulárních nástrojů je dostupná pro zjištění změn v genomické sekvenci. Takové metody zahrnují, ale nejsou omezeny na, zjištění polymorfismu délek restriktivního fragmentu (Gebhardt a Salamini, *Int. Rev. Cytology.*, 135, 201 až 237 (1992)) a kvantitativní na PCR založené metody detekce, jako je amplifikační použití fluorescenčních primerů např. systémy primerové zkoušky TaqMan (Ibrahim a kol., *Anal. Chem.*, 70, 2013 až 2017 (1998)). Výběr detekčních metod bude záviset na specifickém genetickém charakteru, ale výhodně by měl být rychlý a poskytovat zřetelně interpretovatelné údaje.

Jak je ukázáno v níže uvedených příkladech, PCR-zkouška štěpením amplifikovaného polymorfního místa (PCR-CAPS) byla vzata v úvahu pro detekci mutantního genu lipoxygenázy-1 linie G. Nukleotidová substituce v genu *lox-1* v linii G v pozici +2347 vnesla další místo rozlišení pomocí restriktivní endonukleázy AatII, které může být zjištěno pomocí zkoušky PCR-CAPS. Vhodné metody detekce pro *lox-1* nejsou omezeny na tuto zkoušku, ale mohou stejně dobře být založeny na TaqManově technologii a ostatních známých způsobech detekce.

Příklady uvedené níže také ukazují, že zkouška PCR-CAPS byla aplikována na 4 generace šlechtitelského materiálu z programu zpětného křížení, kde fenotyp s nízkou aktivitou lipoxygenázy v linii G byl systematicky zpětně nakřížen do kultivaru Alexis. Ukazuje se, že dědičnost fenotypu s nízkou

aktivitou lipoxygenázy sleduje dědičnost podle genu *lox-1* a fenotyp byl identifikován jako recesivní a byl pozorován pouze v liniích homozygotních pokud jde o gen *lox-1*.

Podle toho, potomstvo rostliny podle tohoto vynálezu zahrnuje šlechtitelské linie, například odvozené v programu zpětného křížení, které obsahují mutantní *lox-1* a exprimují fenotyp s nízkou aktivitou lipoxygenázy.

7. Proces vaření

Rostliny ječmene podle tohoto vynálezu, včetně částí rostlin, potomstva rostlin, zrna a rostlinných produktů jako je slad a mladina, které vykazují nízkou aktivitu lipoxygenázy-1, jsou zde představeny jako užitečné pro výrobu nápojů, které vykazují snížené hladiny volného trans-2-nonenalu po měřený časový úsek nebo za podmínek skladování za zvýšené teploty, ve srovnání s nápoji vyráběnými ze standardního typu kontrolní odrůdy ječmene. Za účelem tohoto srovnání je obsah sulfitu v pivě upraven do 5 dílů na milion nebo méně, jelikož je uznáváno, že vyšší hladiny sulfitu v době plnění do lahví dočasně zdržují výskyt trans-2-nonenalu. Například pivo vařené ze sladu pocházejícího z mutovaného ječmene linie G popsané zde, mají stabilizované organoleptické vlastnosti po měřený časový úsek ve srovnání s pivem vařeným ze sladu pocházejícího z kontrolního nemutovaného ječmene.

Zkušební vaření a hodnocení lahvového piva poskytují nejlepší způsob pro hodnocení vlivu různých přísad na kvalitu a stabilitu hotového piva. Pro zkoušku vlivu sladů z různých ječmenů, je potřeba dostatečné množství zrn ječmene pro provedení zkušebních sladování a vaření v poloprovozním a

poloprůmyslovém měřítku. Během doby růstu ječmene, může být hodnocena pěstební charakteristika linie ječmene. Vlastnosti linie ječmene pro výrobu sladu mohou být hodnoceny během výroby sladu v poloprovozním nebo průmyslovém měřítku a měly by se nacházet v rámci doporučení pro národní kvalitu výroby sladu, např. doporučení Evropského sdružení výrobců piva (European Brewing Convention) pro kvalitu výroby sladu (Analytika-EBC/European Brewing Convention, 1998, publikace Hans Carl Getränke-Fachverlag, Norimberk, Německo). Po vaření v poloprovozním nebo poloprůmyslovém měřítku je pivo plněno do hnědých lahví a ochlazeno na 5 °C pro skladování v optimálním režimu. V tomto stadiu může být čerstvě uvařené pivo analyzováno zkušenými skupinami ochutnávačů pro zjištění specifických chutí a vůní piva, včetně nestandardní chuti a vůně sloučeniny trans-2-nonenalu. Navíc je pivo chemicky analyzováno na hlavní složky chuti a vůně, včetně trans-2-nonenalu. Tyto metody analýzy kvality piva známé tím, že ukáží dlouhodobou stabilitu piva, například po zpracování nuceným stárnutím, jsou potom na pivo opakovaně uplatňovány po různých podmínkách skladování.

Jak je ukázáno v níže uvedených příkladech, linie G ječmene byla pěstována na poli po několik období, aby bylo možné sladovat 10 tun této linie v průmyslové sladovně. Z kontrolních odrůd ječmene kultivar Vintage a kultivar Nevada, které obě obsahují fenotyp se standardním typem LOX-1, byl slad vyráběn za podobných podmínek. Sušený slad z linie G a kontrolních kultivarů ječmene se nacházel v rámci technických podmínek vyžadovaných pro poloprůmyslová zkušební vaření.

Zkušební vaření byla prováděna v 30-hektolitrovém měřítku a hodnocení čerstvě do lahví plněných piv ukázalo, že piva vařená ze sladu, jak linie G, tak kontrolních kultivarů mají

obsah trans-2-nonenalu pod prahem zjistitelným chutí a byly skupinou ochutnávačů pokládány za uspokojivé. Dvě zpracování nučeným stárnutím, buď skladováním při 37 °C po 7 dní nebo skladováním od 6 do 12 týdnů při 30 °C, byla použita pro hodnocení chuťové a aromatické stability piva. Bylo zjištěno, že chuťová a aromatická stabilita piva uvařeného ze sladu z linie G je vyšší než piva z kontrolního sladu, jak vzhledem k hodnocení skupinou ochutnávačů, tak stejně jako pokud jde o hladinu trans-2-nonenalu a bylo zjištěno, že zlepšení je statisticky významné.

Příklady použití vynálezu

Předkládaný vynález se dále blíže vymezuje v níže uvedených příkladech. Mělo by se rozumět, že tyto příklady, zatímco naznačují výhodná ztělesnění, se uvádějí pouze ilustrativním způsobem.

Příklad 1

Zjištění a selekce mutantů isozymu lipoxygenázy z mutagenizovaného ječmene

1. Mutageneze ječmene

Zrna ječmene, *Hordeum vulgare* kultivar Vintage a kultivar Caruso, se mutagenizují azidem sodným podle publikovaného postupu (Kleinhofs a kol., Mutation Research, 51, 29 až 35 (1978)). Mutageneze vnáší body mutace do genomické DNA, které například mohou mít za následek změny aminokyseliny v kódovaných proteinech. Mutovaná zrna M1 se po dvě generace pěstují ve skleníku a zrno M3 se sklídí pro třídění, Pozorovaná četnost mutantů v jednom povahovém rysu genu v generaci M2, podle Kleinhofs a kol., 1978, viz výše, je 1,0

až 2,7 mutantů na 10 000 zrn z generace M2. Jelikož většina genových mutací je recesivní a je zjistitelná pouze v homozygotním stavu, mutagenizovaná populace se vytřídí ze M3 generace, kde se očekává, že podíl homozygotních mutantů zrna je vyšší. Očekává se, že četnost mutace v mutagenizovaném materiálu z M3 je od 0,9 do 2,3 na 10 000 zrn.

2. Nedestruktivní zkouška aktivity lipoxygenázy-1 (LOX-1) a lipoxygenázy-2 (LOX-2) v mutagenizovaném zrně M3

Postup rychlého vyšetření pokud jde o zjištění zrn mutantů ječmene se sníženou aktivitou LOX-1 se vyvinula podle následujících kritérií:

postup vyšetření nemá bránit růstu zrn/sazenic; tkáň vybraných zrn/sazenic by měla exprimovat kvantifikovatelné úrovně lipoxygenázové aktivity; zkouška by měla odlišit aktivitu LOX-1 od aktivity LOX-2; a postup zkoušky by měl obsáhnout mnohočetné vzorky.

Úrovně celkové aktivity lipoxygenázy v různých tkáních klíčícího zrna, jmenovitě výhoncích, kořenech a skutečné tkáni zárodku a endospermu se zkouší následovně: extrakty ze tkáně sazenic ječmene se připraví homogenizací tkáně v ledové 20mM tris-chlorovodíkové kyselině (tris-HCl), pH 7,5, obsahující 2 mM azidu sodného a 0,5 mM fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF), načež následuje odstranění nerozpustných látek odstředěním při 1000 g po 10 minut. Aktivita lipoxygenázy ve 100 μ l extraktu se zkouší při 25 °C přidáním 2,9 ml 20mM substrátu kyseliny linoleové, připraveného disperzí 35 μ l linoleové kyseliny (volná kyselina, L-1376, Sigma, USA) v 5 ml vody obsahující 1 % Tween 20. Reakce se sleduje spektrofotometricky, kde rychlost zvýšení v absorbanci při 234 nm (A_{234nm}), z důvodu tvorby

konjugovaného dienu v hydroperoxidovém produktu, je úměrná aktivitě přítomného enzymu. Jedna jednotka lipoxygenázové aktivity je definována jako $\Delta A_{234} = 0,001$ za minutu v 3-ml reakční směsi, což odpovídá oxidaci 0,12 μmol linoleové kyseliny.

Listová tkáň ze zrna, které se klíčí po 4 dny ve tmě vykazuje nejvyšší zjištěné úrovně lipoxygenázové aktivity (Holtman a kol., Plant Physiology, 111, 569 až 576 (1996)). Špičky listů ze 4-denních sazenic se tudíž vybírají pro zkoušku nedestruktivním vyšetřením na lipoxygenázu. Optimální pH z celkové aktivity lipoxygenázy ječmene se zkouší mezi pH 4,5 a pH 9,0 a zjistí se, že je jím hodnota pH 6,5. Tudíž 25mM HEPES pufer (pH 6,5) obsahující 0,2 M orthoborité kyseliny se vybere pro vyšetřovací zkoušku.

Jelikož jak LOX-1, tak LOX-2 enzymy se imunologicky zjišťují ve výhoncích 4-denních sazenic (Holtman a kol., 1996, viz výše) používají se specifické zkoušky na LOX-1 a LOX-2. Zjistilo se, že inhibitor lipoxygenázy nordihydroguajaretová kyselina (NDGA), kterou identifikoval Eskin a kol., Crit. Rev. Food, Science and Nutrition, 9, 1 až 40 (1997), je selektivním inhibitorem lipoxygenáz ječmene. NDGA v koncentraci 1×10^{-5} M silně inhibuje čištěnou LOX-2 ječmene, zatímco LOX-1 si zachovává 47 % aktivity (obr. 1). Selektivita tohoto inhibitoru se testuje při zkoušce špiček listů, pomocí stanovení poměru 9-hydroperoxyoktadekanoidu (9-HOPD) k 13-hydroperoxydekanoidu (13-HOPD), které jsou výsledkem oxidace linolové kyseliny LOX-1 a LOX-2. Při lipoxygenázové zkoušce špiček listů kultivaru Vintage, podíl vytvořeného 13-HOPD klesl z 24,5 % na 9,5 % na základě přidání 1×10^{-5} M NDGA.

Selektivní zkouška na aktivitu LOX-2 v extraktech ze špiček listů se zakládá na použití specifické monoklonální protilátky LOX-1 (5D2) (Holtman a kol., 1996, viz výše) pro imunoprecipitaci LOX-1 přítomné v extraktech. Zbytková aktivita lipoxygenázy zjištěná v extraktech po precipitaci LOX-1 poskytuje míru aktivity LOX-2. Účinnost této imunoprecipitace (popsaná níže) se hodnotí kvantifikací zbytkové LOX-1 a LOX-2 v kapalině extraktu nad sraženinou pomocí zkoušky ELISA, využívající specifické monoklonální protilátky proti LOX-1 (označené 5D2) a LOX-2 (označené 5,8) (Holtman a kol., 1996, viz výše). Imunoprecipitace LOX-1 z extraktů z konečků listů kultivaru Vintage odstraní 85 % proteinu LOX-1 a 15 % proteinu LOX-2.

Imunoprecipitace se provádí v 96-jamkové plotně s V-dnem přidáním 5 μ l 5D2 povlečených Dynakuliček (Dynal) a 75 μ l pufru [20mM tris-HCl, pH 7,5, 1% objem/objem séra z telat skotu (HyClone)] do 20 μ l každého extraktu ze špiček listů. Plotna se inkubuje na protřepávače titrovacích ploten (MTS4, IKA, Labor Technik) po 1 hodinu při 4 °C. Imunoprecipitát se peletuje odstředěním při 4 °C v odstředivce Sigma 302-K po 10 minut při frekvenci otáček 2000 za minutu. Kapalína nad sraženinou (70 μ l) z každého vzorku se zkouší na aktivitu lipoxygenázy v 96-jamkové plotně s plochým dnem, jak je popsáno níže, ale s přidavkem 100 μ l zkušební pufru (25 mM HEPES, 0,2 M borité kyseliny, pH 6,5).

Zkoušky LOX-1 a LOX-2 se upraví pro zjišťovací metodu o vysokém výkonu. Špičky listů (1 cm) z osmi 4 dny klíčených zrn se jednotlivě homogenizují v 150 μ l ledového pufru (20 mM tris-HCl, pH 7,5) po 2 x 30 sekund v multijamkovém homogenizéru (Berg a kol., Electrophoresis, 13, 76 až 81 (1992)). Po odstředění po 15 minut frekvencí 3000 otáček za

minutu, se 40 μ l kapaliny extraktu nad sraženinou převede do 96-jamkové plotny s plochým dnem. Do každé jamky se přidá 170 μ l pufru (25 mM HEPES, 0,2 M borité kyseliny, pH 6,5, 1×10^{-5} M NDGA) a 10 μ l substrátu (20 mM linolové kyseliny) a potom se inkubuje 20 minut při 25 °C. Reakce se ukončí přidáním 20 μ l nasyceného roztoku jodidu draselného (KI) a inkubuje se dalších 8 minut při 25 °C. Redox reakcí mezi hydroperoxydiany a jodidem draselným vzniká jod (I_2), který se sleduje pomocí jeho extinkčního maxima při 350 nm v čtecím zařízení mikroploten (Multiskan MCC/340).

3. Identifikace potenciálních mutantů lipoxygenázy-1 v M3 a M4 zrnu mutagenizovaného ječmene

Zrno z generace M3 kultivaru Vintage a kultivaru Caruso se skladuje při 45 °C po 6,5 dne pro zrušení klidového stavu, což zajišťuje 95% klíčivost. Zrno M3 kultivaru Vintage (9318) a kultivaru Caruso (9633) se klíčí a třídí na linie, jejichž aktivita LOX-1 je 15% nebo nižší než zrna standardního typu. Domnělé mutantní linie (linie 50 kultivaru Vintage a 42 kultivaru Caruso) se pěstují do generace M4, sklídí se a naklíčené zrno se znovu vyšetří. Fenotyp mutantu LOX-1 se potvrdil v jedné linii kultivaru Vintage a šesti liniích kultivaru Caruso, po měření aktivity lipoxygenázy v extraktech z 5 špiček listů z každé linie. Když se aktivity LOX-1 a LOX-2 v klíčících zárodcích z těchto 7 domnělých mutantů podrobí zkoušce, pouze mutant kultivaru Vintage (označený linie G) vykazuje větší snížení aktivity LOX-1. V zralém zrnu v klidovém stadiu je lipoxygenázová aktivita přítomná v zárodku téměř výlučně aktivitou LOX-1, z důvodu odlišujících se vlastností těchto dvou isozymů (Schmitt a van Mechelen, Plant Sci., 128, 141 až 150 (1997)). Celková aktivita lipoxygenázy v extraktech ze zárodků ze suchého zralého zrna

linie G (generace M5) je $0,06 \pm 0,04$ jednotek/mg proteinu ve srovnání s $0,74 \pm 0,44$ jednotek/mg proteinu v extraktech ze zárodku z kultivaru Vintage, jak se určí pomocí spektrofotometrické zkoušky na lipoxxygenázu, která je popsána v části 2 příkladu 1. Zjistilo se, že aktivita zbytkové lipoxxygenázy ve zárodcích ze zralého zrna linie G jak v M4 tak M5 generacích je přibližně 9 % mateřské linie.

Příklad 2

Linie G je mutantem kultivaru Vintage s fenotypem o nízké aktivitě lipoxxygenázy

Agronomické vlastnosti mutantního fenotypu linie G se analyzují v materiálu z generace M5. Počáteční analýzy se provádějí pro potvrzení, že analyzovaný materiál M5 je homozygotní pokud jde o mutantní fenotyp. Fenotyp s nízkou aktivitou LOX-1 v linii G, zjištěný v generaci M3, může pocházet z dominantní nebo recesivní mutace. Jestliže linie G vybraná v generaci M3 je homozygotní pro dominantní mutaci, potom následující generace budou vykazovat segregaci pokud jde o fenotyp. Aktivita lipoxxygenázy v 26 jednotlivých zárodcích linie G ze zrna ve stavu klidu generace M5 se měří a srovnává se zárodky standardního typu kultivaru Vintage. Aktivita lipoxxygenázy ve všech zárodcích linie G je velmi nízká, s průměrem $0,06 \pm 0,04$ jednotek lipoxxygenázy na mg proteinu ve srovnání s $0,74 \pm 0,44$ jednotek lipoxxygenázy na mg proteinu v zárodcích ze standardního typu kultivaru Vintage. Tyto údaje potvrzují, že linie G v generaci M5 je homozygotní pokud jde o vlastnost, kterou je nízká aktivita lipoxxygenázy.

1. Linie G vykazuje fyziologii růstu a vývoje zrna standardního typu rostliny

Zrno linie G a kultivaru Vintage klíčí a roste v klimatické komoře při 16 hodinách světla při 15 °C a 8 hodinách tmy při 12 °C a relativní vlhkosti 80 %. Růstové charakteristiky rostlin linie G a kultivaru Vintage jsou podobné vzhledem k výšce rostliny, počtu výhonků na rostlinu, začátku květu a počtu zrn na klas. Hmotnost v čerstvém stavu (obr. 2) a suchá hmotnost (obr. 3) zrna linie G a standardního typu kultivaru Vintage během vývoje od 5 dní po květu (DAF) do plné zralosti, přibližně 90 DAF, jsou velmi podobné.

2. Zrno linie G vykazuje fenotyp s nízkou aktivitou lipoxxygenázy po celý vývoj

Aktivita lipoxxygenázy se měří v extraktech vyvíjejícího se zrna ječmene linie G (generace M5) a standardního typu kultivaru Vintage. Zrna se homogenizují v pufru z 20 mM ledové tris-HCl o pH 7,5, který obsahuje Nonidet P-40 0,1 % (objem/objem), neiontový detergent, který zvyšuje extrakci lipoxxygenázy, a odstředí se při 15 000 g po 20 minut pro odstranění nerozpustných látek. Aktivita lipoxxygenázy v extraktech se měří polarograficky v 200 µl kyslíkem nasyceného pufru (0,2 M borité kyseliny, 25 mM HEPES, pH 6,5), který obsahuje 1,2 mM linolové kyseliny při 25 °C, přičemž se pro měření spotřeby kyslíku používá Clarkův typ elektrody. Aktivita lipoxxygenázy se zvýší během prvních 20 dní vývoje zrna jak v linii G, tak v zrně standardního typu, ale pouze v linii G skutečně úroveň aktivity klesne během zrání zrna (obr. 4).

Relativní množství 9-HOPD a 13-HOPD, které se vytvoří během oxidace linolové kyseliny poskytuje míru úrovní aktivity LOX-1 a LOX-2 v extraktech ze zrna. V tomto případě se Nonidet P-40 vynechá z pufru extraktu ze zrna, aby se vyloučila ko-

-extrakce hydroperoxid spotřebovávajících enzymů. Extrakty (100 μ l) smíchané s 10 ml 50mM fosfátového pufru, pH 6,5, který obsahuje 200 μ M linolové kyseliny se inkubují po 20 minut. Reakce se ukončí úpravou pH na 3,5 a přidá se vnitřní standard. Hydroperoxidy vytvořené při zkoušce se váží na oktadecylové koloně bez kapalně fáze (Bakerbond, Baker) a eluují se methanolem. 9-HOPD a 13-HOPD se potom oddělí pomocí vysoce výkonné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi na koloně C-18 s isokratickým elučním rozpouštědlem (tetrahydrofuran : methanol : voda : octová kyselina, 25 : 30 : 44,9 : 0,1 (objem/objem) upraveným na pH 5,5 koncentrovaným amoniakem) při rychlosti průtoku 0,5 ml/min jak popisuje Aarle a kol., FEBS Letters, 280, 159 až 162 (1991). Hydroperoxidy se zjišťují při 234 nm a píky HOPD se upraví vůči vnitřnímu standardu, prostaglandinu B2.

Obr. 5 ukazuje, že 13-HOPD je hlavním produktem aktivity lipoxygenázy přítomné v zrna během prvních 20 dnů po květu (20 DAF), zatímco 9-HOPD vytváří lipoxygenáza aktivní během zrání zrna. Zatímco extrakty jak ze zrna linie G, tak ze zrna standardního typu sdílejí podobný profil syntetizační aktivity 13-HOPD, linie G nevykazuje zvýšení syntetizační aktivity 9-HOPD standardního typu. Tyto údaje jsou shodné s úbytkem aktivity LOX-1 při zrání zrna linie G ječmene.

3. Zrno linie G vykazuje fenotyp s nízkou aktivitou lipoxygenázy-1 při klíčení

Celková aktivita lipoxygenázy v extraktech ze zárodků zrna klíčeného při 15 °C se zkouší podle popisu v příkladu 1. Aktivita lipoxygenázy přítomné v standardním typu zrna v klidovém stavu klesá během prvních 4 dnů klíčení a potom se

zvyšuje (obr. 6). V linii G, aktivita lipoxygenázy v zrne v klidovém stavu je velmi nízká, ale zvyšuje se po 4 dnech.

Analýza hydroperoxidů vytvořených aktivitou lipoxygenázy v klíčících zárodcích ukazuje, že 9-HOPD je hlavním produktem lipoxygenáz přítomných v zrne standardního typu v klidovém stavu (obr. 7). Úroveň tvorby 9-HOPD klesá s poklesem aktivity lipoxygenázy v extraktech. Zvýšení aktivity lipoxygenázy po 4 dnech je doprovázeno tvorbou jak 9-HOPD, tak 13-HOPD. Nízká aktivita lipoxygenázy v zrne linie G v klidovém stavu se spojuje s nepřítomností tvorby HOPD, zatímco zvýšení aktivity po 4 dnech produkuje hlavně 13-HOPD. Tyto údaje poskytují důkaz, že aktivita LOX-1, která vede k tvorbě 9-HOPD je velice snižená v zárodcích jak vyvíjejícího se zrna, zrna v klidovém stavu, tak klíčícího zrna ječmene linie G, zatímco aktivita LOX-2, která vede k tvorbě 13-HOPD se v linii G nemění.

Příklad 3

Linie G obsahuje mutantní gen lipoxygenázy-1 (lox-1) způsobující fenotyp s nízkou aktivitou lipoxygenázy

Molekulární základ pokud jde o fenotyp linie G s nízkou aktivitou LOX-1 se zkoumá pro získání úplného popisu mutantu. Pro získání úplné charakteristiky fenotypu se provádějí následující analýzy:

1. Lipoxygenáza-1 se syntetizuje ve vyvíjejícím se a klíčícím zrne linie G

Western blot analýzy extraktů ze zárodků z vyvíjejícího se a klíčícího zrna ječmene se provádí paralelně s měřením aktivity lipoxygenázy, podle popisu v příkladu 2. Surové extrakty se separují pomocí elektroforézy gelu dodecylsulfát

sodný-polyakrylamid (SDS-PAGE) podle Laemmli, *Nature*, 227, 680 až 685 (1970). Separované proteiny se převedou do nitrocelulózy pomocí polosuchého přenosu, podle Towbin a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 76, 4350 až 4354 (1979). Přenos se zkoumá pomocí specifické monoklonální protilátky LOX-1, 5D2, jak popisuje Holtman a kol., *Plant Physiology*, 111, 569 až 576 (1996), v 500-násobném zředění, po kterém následuje inkubace s kozí anti-myší protilátkou kondenzované k alkalické fosfatáze, a zjišťuje se pomocí substrátů alkalické fosfatázy nitro-tetrazoliové modři a 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfátu jak popisuje Holtman a kol., *Plant Physiol.*, 111, 569 až 576 (1996). Western analýza odhalila, že protein LOX-1 se zjistí v zárodcích kultivaru Vintage v zrně vyvíjejícím se od 10 DAF a hladina se zvyšuje během zrání zrna (obr. 8). Protein je také přítomný v zárodku ze zrna v klidovém stavu kultivaru Vintage, ale pomalu se snižuje během klíčení (obr. 9). Ačkoliv LOX-1 se zjistí v extraktech ze zárodků linie G a migrátech v SDS-PAGE jako protein velikosti podobné k LOX-1 kultivaru Vintage, imunologicky zjistitelné hladiny proteinu v linii G jsou mírně nižší než v kultivaru Vintage.

2. Gen *lox-1* se exprimuje ve vyvíjejícím se a klíčícím zrně linie G

Celá RNA se izoluje ze zárodků vyvíjejících se a klíčících zrn ječmene, podle postupu od autorů Hengsens a van Os-Ruygrok, *Rice Genet. Newslett.*, 6, 163 až 168 (1989), souběžně s měřením aktivity lipoxygenázy, které je popsáno v příkladu 2. Vzorky RNA (7 µg) se separují na denaturujících agarových gelech a přenášejí se Northern blott jak popisuje Sambrook a kol., v *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989. Přenosy se hybridizují s ³²P-označenou sondou vytvořenou

z 3'netranslatované oblasti, nukleotidy 2659 až 2801 [sekvence identifikační číslo: 1], z cDNA *lox-1* (EMBL přírůstek č. L35931) podle popisu od Holtman a kol., *Plant Physiol.*, 111, 569 až 576 (1996), za použití soupravy Amersham Random Prime Kit.

Přepisy *lox-1* kódující LOX-1 se zjistili v zárodcích z vyvíjejícího se a zralého zrna kultivaru Vintage a linie G od 30 DAF (obr. 10). Hladina přepisů *lox-1* se zvyšuje během klíčení v zárodcích jak kultivaru Vintage, tak linie G, což naznačuje novou (de novo) expresi genu *lox-1* (obr. 11). Jelikož zjistitelné hladiny přepisů *lox-1* jsou podobné v zárodcích linie G a kultivaru Vintage, ani snížený přepis *lox-1* ani stabilita přepisu se nemůže přičítat fenotypu linie G s nízkou aktivitou lipoxxygenázy.

3. Gen *lox-1* linie G kóduje mutantní formu lipoxxygenázy-1

Nukleotidová sekvence genu *lox-1* linie G a kultivaru Vintage se analyzují a porovnávají pro určení molekulárního základu pro fenotyp linie G s nízkou aktivní LOX-1, který je charakterizován pomocí normální transkripce genu *lox-1*, a v neposlední řadě sníženou akumulací a aktivitou exprimovaného lipoxxygenázového enzymu v zrna.

Genomická DNA z linie G a standardního typu kultivaru Vintage se izoluje z tkáně listů sazenic podle způsobu, který popsali Pich a Schubert, *Nucleic Acids Res.*, 21, 3328 (1993). Gen *lox-1* v preparátech genomické DNA se amplifikuje pomocí reakce řetězce polymerázy (PCR) za použití primerů založených na sekvenci genu *lox-1* ječmene (van Mechelen a kol., *BBA*, 1254, 221 až 225 (1995); Rouster a kol., *Plant J.*, 11, 513 až 523 (1997). Pozice a sekvence oligonukleotidových primerů,

které se používají pro amplifikaci promotoru lox-1 a kódujících oblastí, označené na obr. 12 jsou následující:

Původní primer 5'-GAA AAG CTT GGA GGT AGA CGC TGC-3' [sekvence identifikační číslo: 2] a reverzní primer 5'-TAT AGG ATC CTT GTT CTT GGC CTC CTC TCC TCG-3' [sekvence identifikační číslo: 3] se používají k PCR amplifikaci promotorové domény lox-1 (-361 až +68) z linie G a kultivaru Vintage.

Původní primer 5'-AGT GAA AAA CAG TGT GCT GGT G-3' [identifikační číslo sekvence: 4] a reverzní primer 5'-GGC TTA AAG AGC AAC TGC TGA-3' [identifikační číslo sekvence: 5] se používají pro PCR amplifikaci kódující oblasti lox-1 linie G.

Původní primer 5'-CAA GAT GCA TAT GCT GCT GGG AG-3' [identifikační číslo sekvence: 6] a reverzní primer 5'-CGA TGG TTT AAA TTA GAT GGA GAT GCT GT-3' [identifikační číslo sekvence: 7] PCR amplifikují kódující oblast lox-1 kultivaru Vintage.

Reakční směsi PCR (reakce řetězce polymerázy) se skládají z 250 ng genomické DNA v 50 µl objemu, který obsahuje 50 pmol primeru a 2 jednotky Pfu DNA polymerázy (Promega) podle dodavatelových instrukcí k enzymu. Amplifikace pomocí PCR se provádějí v zařízení Stratagene Robocycler: 1 minuta při 94 °C, 1 cyklus; 1 minuta při 94 °C, 2 minuty při 62 °C a 5 minut při 72 °C, 30 cyklů; 10 minut při 72 °C, 1 cyklus. Produkty PCR se separují na 1,2% agarosových gelech. Fragmenty DNA odpovídající v délce amplifikované oblasti se čistí za použití gelové extrakční soupravy Qiax II (Qiagen) a klonují se do plasmidu pcDNA2.1 (Invitrogen). Nukleotidové sekvence jak z řetězů klonovaného promotoru lox-1, tak kódujících oblastí se určí za použití terminační reakce dideoxynukleotidového

řetězce se specifickými oligonukleotidovými primery a analyzují se na genetickém analyzátoru ABI PRISM® 310 (PE Biosystems). Srovnání sekvencí se provádějí za použití balíčku softwaru pro analýzu sekvencí DNA STAR (DNA STAR Inc., USA).

Promotorová oblast a struktura intron-exon z kódující oblasti lox-1 ječmene jsou zobrazeny na obr. 13 a odvozují se ze srovnání nukleotidové sekvence z genomických a cDNA sekvencí lox-1 ze standardního typu (obr. 12). Sekvencovaná oblast z promotorové oblasti lox-1 od -363 do +68, (číslováno relativně k stanovenému počátečnímu místu transkripce; van Mechelen a kol., BBA, 1254, 221 až 225 (1995)), je dostatečná pro řízení charakteristiky pro embryo specifické a dočasně řízené genové exprese nativního genu (Rouster a kol., Plant J., 15, 435 až 440 (1998)). Promotorová a přepisovaná oblast genu lox-1 standardního typu [sekvence identifikační číslo: 8] je 4663 nt v délce a obsahuje 6 intronů mezi 82 nt a 634 nt v délce, které nejsou přítomné z příslušné cDNA [sekvence identifikační číslo: 10] a musí se proto odstranit během úpravy přepisu sestřihem.

Srovnání nukleotidové sekvence z lox-1 linie G s nukleotidovou sekvencí standardního typu (obr. 12) ukazuje, že alela lox-1 linie G vykazuje mutace ve dvou bodech. Jednou je tichá substituce C→T v pozici 221 v exonu 1 a druhou je substituce G→A v pozici 2347 v exonu 3 (obr. 13). Gen lox-1 standardního typu ječmene kóduje protein z 862 zbytků aminokyseliny [sekvence identifikační číslo: 9], zatímco mutace v pozici 2347 v alele lox-1 linie G způsobuje substituci aminokyseliny z glycinu na aspartovou kyselinou v zbytku 368 v kódovaném proteinu.

Seřazení příbuzných rostlinných lipoxygenáz naznačuje, že glycin-368 v LOX-1 ječmene, je silně konzervován. Mimoto tento zbytek, který odpovídá glycinu-353 v LOX-1 soji, je jedním z 51 neutrálních nebo hydrofóbních zbytků, které vyplňují kavitu substrátu enzymu, jak je vidět z jeho krystalické struktury (Minor a kol., Biochemistry, 35, 10 687 až 10 701 (1996)) a je zobrazen na (obr. 22). Vložení elektricky nabitého zbytku aminokyseliny v této pozici tudíž pravděpodobně narušuje strukturální a funkční vlastnosti enzymu.

4. Mutovaný protein LOX-1 kódovaný alelou lox-1 linie G vykazuje nízkou enzymatickou aktivitu a je zodpovědný za fenotyp linie G s nízkou aktivitou lipoxygenázy

Mutageneze zrna kultivaru Vintage azidem sodným, který způsobí mutovanou alelu lox-1 v linii G, může vyvolat dodatečné mutace v genomu linie G. Dva experimentální přístupy se přijímají pro demonstraci, že mutantní alela lox-1 v linii G je zodpovědná za její fenotyp s nízkou aktivitou lipoxygenázy, spíše než jiné mutace v genomu. Enzymatická aktivita LOX-1 kódovaná mutantem a alelou lox-1 standardního typu se stanovuje pro ověření, že substituce glycin→aspartová kyselina v mutantním enzymu způsobuje sníženou stabilitu a aktivitu. Dva geny lox-1 se dočasně exprimují v aleuronových protoplastech izolovaných z nasáknutého zralého zrna, jelikož se očekává, že úroveň endogenní exprese lipoxygenázy v těchto buňkách je pod limity zjistitelnosti. Žádný z identifikovaných lipoxygenázových genů ječmene, které se exprimují v klíčícím ječmeni, se nezjistí v aleuronové tkáni (van Mechelen a kol., 1999, viz výše). Pro řízení dočasné exprese genu lox-1 v aleuronových protoplastech, se jejich kódující oblasti

translačně fúzí ke konstitutivnímu promotoru, o kterém je známo, že je v těchto protoplastech aktivní.

Kódující oblasti z mutantu (pozice sekvence od +1 do +4350) a standardního typu genu *lox-1* (pozice sekvence od +69 do +4230) a standardního typu cDNA *lox-1* (pozice sekvence od +69 do +2654) každý klonovaný v plasmidu *pcDNA2.1* (viz část 3), se excizují digerací míst *KpnI* a *EcoRV* v polyspojovníku vektoru. Kódující oblasti se klonují v plasmidu *pUBARN* (Jensen a kol., *Hereditas*, 129, 215 až 225 (1998)) mezi konstitutivně aktivním kukuřičným ubichitinovým *Ubi* promotorem (jak se popisuje v US patentu č. 05510474A) a *Nos* terminátorem, v místě tyčového genu, který kóduje fosfinotricinacetyltransferázu (obr. 14).

Protoplasty se izolují z aleuronové tkáně nasáknutého *Hordeum vulgare* (ječmen obecný) kultivar Himalaya podle protokolu z práce od Skriver a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88, 7266 až 7270 (1991). Stejně díly z 2×10^5 protoplastů se transfekují při 0 °C s přibližně 100 µg plasmidu DNA (ekvimolární množství z každého plasmidu) pomocí polyethylen-glykolem (PEG) zprostředkované absorpce DNA (Lee a kol., *Plant. Mol. Biol.*, 13, 21 až 29 (1997)) a potom se inkubují v prostředí kultury aleuronových protoplastů při 25 °C jak dříve popsal (Skriver a kol., 1991, viz výše). Po 48 hodinách inkubace se prostředí kultivace opatrně odstraní a protoplasty se resuspendují a homogenizují v 300 µl pufru ze zkoušky na lipoxygenázu (0,2 mM borité kyseliny, 25 mM HEPES, pH 6,5). Homogenáty se odstřeďují při 15 000 g po 5 minut pro peletizaci nerozpustného materiálu a kapaliny nad sedimentem (10 µl) se následně zkouší na celkovou aktivitu lipoxygenázy za použití rychlé vyšetřovací zkoušky popsané v příkladu 1, část 1, ale s vynecháním inhibitoru NDGA. Obsah proteinu

v protoplastových extraktech se měří pomocí Bradfordova testu vázání barviva (Bradford, Anal. Biochem. 72, 248 (1976)), který dodávají Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA, a aktivita lipoxygenázy se vyjadřuje na mg proteinu v extraktu.

Protoplasty transfekované s kontrolním plasmidem, pUBI-GUS, kde kukuřičný promotor z ubichitinu-1 řídí expresi reportérového genu β -glukoronidázy, vykazují nezjistitelnou aktivitu lipoxygenázy. Dočasné exprese standardního typu genu lox-1 a cDNA v protoplastech poskytují obě vysoké úrovně aktivity lipoxygenázy v protoplastových extraktech (obr. 15). Vyšší exprese cDNA standardního typu lox-1 ve srovnání s genomickou sekvencí se může uskutečnit z důvodu vyšší četnosti transfekce pokud jde o menší plasmid exprese cDNA lox-1 (4929 párů bází proti 6505 párům bází konstruktu genu lox-1). Dočasná exprese mutantu genu lox-1 poskytuje nízké hladiny aktivity lipoxygenázy, přibližně 10 % aktivity lipoxygenázy standardního typu. Tyto údaje jasně demonstrují, že mutantní gen lox-1 v linii G kóduje lipoxygenázu se značně sníženou aktivitou, která odpovídá fenotypu s nízkou aktivitou lipoxygenázy.

Příklad 4

PCR-zkouška štěpením amplifikovaného polymorfního místa (PCR-CAPS): Metoda používaná pro identifikaci mutantu genu lox-1

Analytická metoda umožňující identifikaci mutantního genu lox-1 linie G v jakémkoliv genetickém profilu se vyvinula na základě zkoušky PCR-CAPS. Zkouška zahrnuje PCR amplifikaci genomických fragmentů DNA, po které následuje digerace amplifikovaných sekvencí specifickou restriční endonukleázou pro znázornění polymorfie délky restriktů (RFLP).

Kódující sekvence z mutantního genu *lox-1* přechovává dvou bodové mutace (viz příklad 3), kde mutace v pozici 2347 (obr. 12) zavádí dodatečné místo štěpení restriční endonukleázou Aat II, které se nezjistí v genu *lox-1* standardního typu (obr. 16). Ukazuje se, že podle zkoušky PCR-CAPS, založené na polymorfismu vytvořeném přítomností tohoto restričního místa v genu *lox-1*, se rozlišuje mezi standardním typem genu *lox-1* a mutovaným genem *lox-1*.

Genomická DNA se izoluje z mladých listů sadby M6 *Hordeum vulgare*, L. kultivaru Vintage a linie G podle postupu od autorů Pich a Schubert (1993, viz výše). Sekvence DNA obsahující pozici 2347 (místo mutace genu *lox-1* linie G) se amplifikuje pomocí PCR, za použití primerů specifických pro gen *lox-1* [sekvence identifikační číslo: 8]. Fragmenty DNA amplifikované vybraným původním primerem 5'-CGCTACGACGTC-TACAACGA-3' [sekvence identifikační číslo: 13] a reverzním primerem 5'-CAGACTACTTTTGGCGGGA-3' [sekvence identifikační číslo: 14] jsou zobrazeny na obr. 17. PCR reakce se provádějí s 250 ng genomické DNA v 50- μ l objemu obsahujícím 50 pmol každého primeru a 1 jednotku Taq DNA polymerázy (Promega) podle instrukcí dodavatele. PCR amplifikace se provádějí na přístroji Stratagene Robocycler následovně: 1 minuta při 94 °C, 1 cyklus; 1 minuta při 94 °C, 1,5 minuty při 60 °C a 2 minuty při 72 °C, 30 cyklů; 10 minut při 72 °C, 1 cyklus. Amplifikované fragmenty mutantu a standardního typu genu *lox-1* jsou přibližně 650 párů bází (obr. 18), odpovídajících očekávané velikosti (obr. 17). Produkty PCR, čištěné na spinové koloně (Qiagen), se digerují s 25 jednotkami restriční endonukleázy Aat II po 24 hodin při 37 °C a analyzují se na 1,2% agarovém gelu.

Digerací PCR produktu standardního typu lox-1 získané fragmenty DNA z 10, 179 a 462 párů bází, a fragmenty z PCR produktu mutantního lox-1 jsou 10, 149, 179 a 313 párů bází, kde další fragmenty DNA jsou způsobeny částečnou digerací PCR produktu lox-1 (obr. 19). Fragmentový model odpovídá očekávané polymorfii délky restriktů (RFLP) pocházející z této mutace, kde fragment z 313 párů bází je jedinečný vzhledem k mutantu lox-1. Tato zkouška PCR-CAPS poskytuje reprodukovatelný a specifický nástroj pro identifikaci alely lox-1 v ječmeni a může tudíž být využita v šlechtitelských programech ječmene zaměřených na zavedení tohoto genu do nových odrůd ječmene.

Příklad 5

Zpětné křížení fenotypu s nízkou aktivitou lipoxygenázy z linie G s kultivarem Alexis demonstruje genetické spojení s mutantním genem lox-1

Opakované zpětné křížení se používá k přenosu fenotypu s nízkou aktivitou lipoxygenázy z linie G do opakujícího se rodiče (v tomto případě kultivaru Alexis). Program zpětného křížení zobrazený na obr. 20, kombinovaný se selekcí pokud jde o fenotyp s nízkou aktivitou lipoxygenázy, progresivně substituuje genom linie G pomocí opakujícího se mateřského genomu. Mimoto se odstraní další mutace zavedené do genomu linie G během mutagenního působení azidu sodného. V prvním zpětném křížení homozygotní linie G s nízkou aktivitou lipoxygenázy (označené genotyp ll) s kultivarem Alexis (označeném genotyp LL) jsou linie potomstva heterozygotní (označené genotyp Ll). Fenotyp s nízkou aktivitou lipoxygenázy z důvodu recesivní mutace není zjistitelný v liniích heterozygotních pokud jde o mutaci. Potomstva jsou samoopylovaná a dávají normální mendeliánské rozdělení populace, totiž 1 LL : 2 Ll : 1 ll. Homozygotní genotyp ll

s nízkou aktivitou *lox* pocházející z prvního křížení bude vykazovat 50 % genetického profilu kultivaru Alexis. Po 10 kolech zpětného křížení, tvoří opakující se mateřský profil přibližně 99,9 %.

Hordeum vulgare, L. kultivar Alexis a linie G se během programu zpětného křížení pěstují ve skleníku. Zrna zpětně kříženého potomstva se klíčí v Petriho miskách na filtračním papíru, nasáklém 4 ml vody po 3 dny při 22 °C ve tmě. Linie s nízkou aktivitou lipoxygenázy se zjišťují pomocí měření celkové aktivity lipoxygenázy v extraktech ze špiček listů (*coleoptile*) (špička 7 mm) z klíčících sazenic, jak se popisuje v příkladu 1. Potomstvo z 3. a 4. zpětného křížení se také analyzuje pokud jde o dědičnost mutantního genu *lox-1* za použití zkoušky PCR-CAPS popsané v příkladu 4.

Očekávaná četnost fenotypu s nízkou aktivitou lipoxygenázy v rozdělení potomstva ze čtyř generací zpětného křížení je 25 % pokud jde o recesivní mutaci. Pozorovaná četnost nízké aktivity lipoxygenázy v potomstvu (24 zrn) ze čtyř generací zpětného křížení je v souladu s očekávanou četností (obr. 20). Když se analyzuje potomstvo z 3. a 4. zpětného křížení, které vykazuje homozygotní genotyp *ll* s nízkou aktivitou *lox*, pomocí zkoušky PCR-CAPS, zjistí se, že všechno obsahuje diagnostický fragment o 313 párech bází, zatímco v potomstvu, které vykazuje standardní typ aktivity lipoxygenázy tento fragment chybí (obr. 21).

Program zpětného křížení demonstruje, že mutantní alela *lox-1* může být převedena do nového genetického profilu a je zděděna v recesivním monofaktoriálním způsobu, který sleduje mendeliánské rozdělení. Jelikož opakující se mateřský základ je 93,8 % v potomstvu ze 4. zpětného křížení, společná

dědičnost mutantního genu *lox-1* a fenotypu s nízkou aktivitou lipoxygenázy poskytuje potvrzení jejich genetického spojení.

Příklad 6

Pivo vařené z ječmenného sladu z linie G akumuluje během skladování méně trans-2-nonenalů, což poskytuje zlepšenou stabilitu chuti a vůně

Hordeum vulgare, L. kultivar Vintage a linie G se pěstují na poli po několik sezón pro získání dostatku zrna pro průmyslové sladování. Provádějí se následující zkušební sladování a vaření v průmyslovém měřítku stejně jako analýza hotového piva pro demonstraci hodnoty ječmene linie G s nízkou aktivitou lipoxygenázy pro zlepšenou stabilitu chuti a vůně.

1. Průmyslové sladování a hvozďení linie G a kultivaru Vintage

Sladování se provádí v 10-tunovém měřítku v průmyslových sladovnách ve dvou zkušebních sladovnách podle následujícího:

Zkušební sladování 1: Zrno ječmene linie G (sklizeň 1996)

Podmínky máčení: 8 hodin zvlhčování; 14 hodin sušení; 8 hodin zvlhčování; 10 hodin sušení; 4 hodiny zvlhčování při teplotě zvlhčovací vody 16 °C. Podmínky sladování: 12 hodin při 18 °C; 24 hodin při 16 °C; 24 hodin při 14 °C; 60 hodin při 12 °C. Podmínky hvozďení: 12 hodin při 60 °C; 3 hodiny při 68 °C; 4 hodiny při 74 °C; 3 hodiny při 80 °C.

Zkušební sladování 2: Kultivar Vintage a linie G (sklizeň 1996/1997)

Podmínky máčení: 8 hodin zvlhčování; 10 hodin sušení; 6 hodin zvlhčování; 15 hodin sušení; 4 hodiny zvlhčování při teplotě zvlhčovací vody 15 °C. Podmínky sladování: 5 dní s přívodem vzduchu při 15 °C a sprejováním pro udržení hladiny vlhkosti. Podmínky hvozdní: 10 hodin při 50 °C; 2,5 hodiny při 80 °C.

Analýzy sladování ze 2 vzorků sladu z linie G ze zkušebního sladování 1 ve srovnání s kontrolním sladem, kultivar Nevada (tabulka 1) a ze zkušebního sladování 2 ve srovnání s kultivarem Vintage (tabulka 2) potvrzuje, že slad z linie G je vhodný pro zkušební vaření.

Tabulka 1

Zkoušební sladování 1				
Odrůda ječmene		kultivar Nevada	linie G	linie G
Rok sklizně		1996	1996	1996
Analýza sladu				
Obsah vlhkosti	%	4,7	4,3	4,4
Čistota extraktu jako is.	% ai.	76,9	76,1	75,3
Čistota extraktu d.m.	% dm.	81,4	79,5	78,7
Čas zcukernatění	min.	<10	<10	<10

Tabulka 1 - pokračování tabulky

Diastatická mohutnost	% WK	252	373	365
Barva	EBC	2,8	4,4	3,8
pH		6,16	5,97	5,99
Turbidita	EBC	9,0	2,5	2,4
Celkový obsah proteinu d.m.	%	10,35	10,74	12,03
Rozpustný dusík	mg/l	647	787	765
Rozpustný protein % d.m. sladu	% dm.	3,7	4,4	4,3
Kolbach		35,3	40,8	35,4
Volný aminový dusík	mg/l	97	125	118
Sypkost	%	89,5	85,6	89,5
Celkově neupravovaná zrna	%	1,1	0,6	0,5
Částečně neupravovaná zrna	%	2,3	1,0	0,6
Beta-glukan v mladíně	mg/l	114	66	36
Beta-glukan ve sladu	% objem/objem	0,24	0,11	0,05

Tabulka 1 - pokračování

S-methyl-methionin/ ekv. DMS	µg/g	2,4	6,4	8,4
Volný DMS	µg/g	1,0	6,6	4,7
NDMA	µg/kg	nezjištěno	0,3/0,6	0,3/0,3

Tabulka 2

Zkoušební sladování 2				
Odrůda ječmene		Vintage	linie G	linie G
Rok sklizně		1996	1996	1997
Obsah vlhkosti	%	4,1	4,1	4,3
Čistota extraktu jako is.	% ai.	77,0	75,6	77,5
Čistota extraktu d.m.	% dm.	80,3	78,8	80,9
Čistota/rozdíl od surového	% dm.	0,7	1,6	1,7
Doba zcukernatění	min.			<10
Diastatická mohutnost	% WK	343	342	268
Barva	EBC	2,5	2,8	3,4
PH		6,05	6,01	6,12
Turbidita	EBC	1,5	1,3	2,5
Celkový protein d.m.	%	10,98	12,22	9,82

Tabulka 2 - pokračování

Rozpustný dusík	mg/l	696	741	610
Rozpustný protein % d.m. sladu	% dm.	3,9	4,1	3,4
Kolbach		35,2	33,7	34,6
Volný aminový dusík	mg/l	110	117	100
Sypkost	%	91,3	81,8	89,5
Celkově neupravovaná zrna	%	0,7	1,1	1,3
Částečně neupravovaná zrna	%	1,0	2,7	2,7
Beta-glukan v mladíně	mg/l	97	172	117
Beta-glukan ve sladu	% objem/objem	-	-	93
S-methyl-methionin/ekv. DMS	µg/g	-	-	-
Volný DMS	µg/g	-		-

2. Průmyslové vaření se sladem z linie G, kultivaru Vintage a kontrolním sladem z kultivaru Nevada

Provedou se dvě zkušební vaření za použití mladiny připravené z linie G a kontrolního sladu z kultivaru Nevada při pokusu 1 a z linie G a kontrolního sladu z kultivaru Vintage při pokusu 2.

Pivo se vaří v 30-hl průmyslovém měřítku se 475 kg sladu podle následujícího schématu: vystírání při 50 °C; 30 minut při 50 °C; 30 minut zahřívání z 50 na 70 °C; 15 minut při 70 °C. Část mladiny se zahřívá po 20 minut ze 70 na 100 °C a 5 minut při 100 °C, zatímco hlavní část rmutu se udržuje na 70 °C po dalších 25 minut a potom se obě části rmutu spojí a udržují se 10 minut na 70 °C. Kroky procesu vaření při vaření mladiny, separace spotřebovaného zrna vířením, chlazení, fermentace, dokvášení a plnění do lahví z hnědého skla se provádějí podle standardní praxe při procesu vaření.

3. Stabilita chuti a aroma a obsah T2N v pivu vařeném z linie G, ze sladu z kultivaru Vintage a kontrolního sladu z kultivaru Nevada

Čerstvě uvažené pivo se skladuje při 5 °C a analyzuje se v průběhu 2 měsíců od výroby. Chuťová a aromatická stabilita čerstvého a skladovaného piva se hodnotí ve dvou nezávislých laboratořích a sledují se dva různé typy podmínek skladování piva. V laboratoři A se pivo vystaví procesu nuceného stárnutí, kde se pivo skladuje při 37 °C po dobu 7 dní, zatímco v laboratoři B se pivo skladuje při 30 °C po 6 až 12 týdnů. Hlady trans-2-nonenalu v pivu se stanovují pomocí plynové chromatografie a detekcí hmotovou spektrometrií, které sledují derivatizaci karbonylů s O-(2,3,4,5,6-pentafluorbenzyl)-hydroxylaminem, který v podstatě popisuje Grönquist a kol., Proceedings of 24th EBC Congress, Oslo, 421 až 428 (1993). Zkušená skupina degustátorů piva hodnotí celkové chuťové a aromatické skóre piva, což zahrnuje zjištění příchuti a vůně zatuchliny, naznačující přítomnost trans-2-nonenalu v pivu.

Laboratoř A: Přípustná odchylka při stárnutí piva

Srovnání piva vařeného z linie G a piva z kontrolního sladu z kultivaru Nevada, při prvním zkušebním vaření (tabulka 3) demonstruje, že pivo z linie G vykazuje vyšší chuťovou a aromatickou stabilitu a nižší obsah trans-2-nonenalů při sledování piva nuceně stárnoucího ve srovnání s kontrolními. Při druhém pokusu srovnání piva vařeného ze sladu z linie G s pivem vařeným ze sladu z kultivaru Vintage, mateřského kultivaru, potvrzuje počáteční hodnoty (tabulka 4).

Tabulka 3

Zkušební vaření 1		
Slad z ječmene	kultivar Nevada	Linie G
Oxid siřičitý, obsah (mg/ml)	1	1
T2N** (části na miliardu (ppb)) - čerstvě uvařené pivo	0,009	0,005
T2N** (části na miliardu (ppb)) - nuceně stárnoucí pivo (37 °C/7 dní)	0,117	0,025
Chuť a vůně* - čerstvé pivo	5,9	5,3
Chuť a vůně* - nuceně stárnuté pivo (37 °C/7 dní)	1,3	5,1

* Stupnice hodnocení chuti a vůně 1 až 10 podle zvyšující se kvality;

** trans-2-nonenal

Tabulka 4

Zkušební vaření 2		
Slad z ječmene	kultivar Vintage	Linie G
Obsah oxidu siřičitého (mg/ml)	2	2,5
T2N ^{**} (části na miliardu (ppb)) - čerstvě uvařené pivo	0,023	0,019
T2N ^{**} (části na miliardu (ppb)) - nuceně stárnuté pivo (37 °C/7 dní)	0,078	0,035
Chuť a vůně* - čerstvé pivo	5,5	6,1
Chuť a vůně* - nuceně stárnuté pivo (37 °C/7 dní)	2,9	5,9

* Stupnice hodnocení chuti a vůně 1 až 10 podle zvyšující se kvality;

** trans-2-nonenal

Laboratoř B: Přípustná odchylka při skladování při 30 °C

Pivo vařené ze sladu z linie G vykazuje nižší hladiny trans-2-nonenalu po 6 a 12 týdnech skladování při zvýšené teplotě 30 °C, když se srovnává s pivem vařeným z jednoho z referenčního sladů (tabulka 5 a 6) a má lepší chuťovou a aromatickou stabilitu jak soudí degustační skupina. Práh chuťové zjistitelnosti pro trans-2-nonenal v těchto analyzovaných pivech leží blízko 0,08 částí na miliardu (ppb).

Tabulka 5

Zkušební vaření 1		
Slad z ječmene	kultivar Nevada	linie G
Trans-2-nonenal (části na miliardu) - čerstvě uvařené pivo	0,050	0,044
Trans-2-nonenal (části na miliardu) - 30 °C/6 týdnů	0,072	0,037
Trans-2-nonenal (části na miliardu) - 30 °C/12 týdnů	0,095	0,046
Trans-2-nonenal chuť a aroma* - čerstvě uvařené pivo	0,6	0,3
Trans-2-nonenal* - 30 °C/6 týdnů	3,7	1,4
Trans-2-nonenal* - 30 °C/12 týdnů	2,5	0,6

* skóre z detekce chuti a vůně trans-2-nonenalu na stupnici 1 až 10

Tabulka 6

Zkušební vaření 1		
Slad z ječmene	kultivar Vintage	linie G
Trans-2-nonenal (části na miliardu) - čerstvě uvařené pivo	0,070	0,062
Trans-2-nonenal (části na miliardu) - 30 °C/6 týdnů	0,093	0,070
Trans-2-nonenal (části na miliardu) - 30 °C/12 týdnů	0,133	0,080
Trans-2-nonenal chuť a aroma* - čerstvě uvařené pivo	0,3	0,9
Trans-2-nonenal* - 30 °C/6 týdnů	2,5	1,7
Trans-2-nonenal* - 30 °C/12 týdnů	2,2	1,3

* skóre z detekce chuti a vůně trans-2-nonenalu na stupnici 1 až 10

Zlepšená stabilita aroma a chuti piva uvařeného ze sladu z linie G, jak se změří pomocí hladin trans-2-nonenalu zjištěných v pivu po skladování při 30 °C ze zkušební vaření z kombinovaného sladu, se ukazuje jako statisticky významná (tabulka 7).

Tabulka 7

Trans-2-nonenal v skladovaném pivě

Čerstvé	Průměr	Standardní odchylka	Rozdíl	2-chvostý protein	Významný ($p < 0,05$)
Referenční	0,060	0,012	0,007	0,34	ne
Linie G	0,053	0,011			

6 týdnů, 30 °C	Průměr	Standardní odchylka	Rozdíl	2-chvostý protein	Významný ($p < 0,05$)
Referenční	0,083	0,013	0,029	0,003	ano
Linie G	0,054	0,021			

12 týdnů, 30 °C	Průměr	Standardní odchylka	Rozdíl	2-chvostý protein	Významný ($p < 0,05$)
Referenční	0,114	0,023	0,051	0,003	ano
Linie G	0,063	0,020			

Jelikož přírodní hladiny sulfitu jsou nízké v obou zkušebních vařeních, hladiny volného trans-2-nonenalu v pívě podrobeném stárnutí velmi věrně odrážejí trans-2-nonenalový potenciál různých piv, hlavně hladinu produktů adice trans-2-nonenalu přítomných v čerstvém pivě. Přidání sulfitu může dočasně pozdržet postup zvětrávání, pomocí zabudování trans-2-nonenalu do komplexu, dokud hladiny sulfitu nesníží oxidace způsobená výměnou plynů skrz obal.

Popsaná zkušební vaření se sladem z ječmene s nízkou aktivitou LOX-1 poskytují první nepochybný důkaz, že aktivita LOX-1 v ječmeni během sladování a procesu vaření je klíčovým determinantem výskytu sloučeniny s nestandardní chutí a vůní trans-2-nonenalu v pivě podrobeném stárnutí.

Výše uvedené popisy zahrnují citace z řady publikací. Každá publikace je zde pro všechny případy zahrnuta formou odkazu, jakoby byla plně vyložena.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Rostlina ječmene nebo její část, která obsahuje mutantní protein LOX-1, rostlina nebo její část charakterizovaná snížením nebo absencí aktivity lipoxygenázy ve srovnání s nemutovanou kontrolní rostlinou nebo její částí.
2. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 1, **v y z n a - č u j í c í s e t í m**, že aktivita lipoxygenázy zahrnuje katalýzu oxidace volných nebo esterifikovaných polynenasycených mastných kyselin a polynenasycených oktadekanových mastných kyselin na formu derivátů 9-hydroperoxy mastné kyseliny.
3. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 1, **v y z n a - č u j í c í s e t í m**, že protein LOX-1 je kódován mutovanou sekvencí nukleové kyseliny lox-1, která obsahuje jednu nebo více mutací.
4. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 3, **v y z n a - č u j í c í s e t í m**, že uvedená jedna nebo více mutací jsou způsobené chemickou mutagenezí nebo ozařováním.
5. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 3, **v y z n a - č u j í c í s e t í m**, že uvedená jedna nebo více mutací jsou způsobené místně cílenou mutagenezí.
6. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 3, **v y z n a - č u j í c í s e t í m**, že uvedená jedna nebo více mutací jsou umístěny v promotorové nebo přepisované oblasti sekvence nukleové kyseliny lox-1.

7. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 1, **v y z n a-
č u j í c í s e t í m**, že uvedený mutantní protein LOX-1 obsahuje kyselé, bazické nebo polární substituce aminokyseliny v jednom nebo více konzervovaných neutrálních nebo hydrofóbních zbytků aminokyseliny vyplňujících kavitu substrátu LOX-1 standardního typu ječmene.
8. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 7, **v y z n a-
č u j í c í s e t í m**, že uvedený mutantní protein LOX-1 obsahuje sekvenci aminokyseliny identifikačního čísla sekvence: 12, ve které Xaa je kyselé, bazická nebo polární aminokyselina.
9. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 8, **v y z n a-
č u j í c í s e t í m**, že Xaa je glutamová kyselina nebo aspartová kyselina.
10. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 9, **v y z n a-
č u j í c í s e t í m**, že Xaa je aspartová kyselina.
11. Transgenická rostlina ječmene nebo její část obsahující heterologní sekvenci nukleové kyseliny exprimující antimediatorovou sekvenci do při nejmenším části přepisované oblasti genu lox-1 ječmene, přičemž heterologní sekvence je nahodile připojena k promotorové sekvenci genu a terminátorové sekvenci transkripce.
12. Transgenická rostlina ječmene nebo její část podle nároku 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený promotorový gen řídí konstitutivní expresi antimediatorové sekvence.

13. Transgenická rostlina ječmene nebo její část podle nároku 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený promotorový gen řídí tkáňově-specifickou nebo dočasně-regulovanou expresi nahodile připojené antimediatorové sekvence v tkáních rostliny.

14. Transgenická rostlina ječmene nebo její část podle nároku 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená tkáň je vyvíjející se, klíčící nebo plně vyvinutou zárodečnou tkání.

15. Transgenická rostlina ječmene nebo její část podle nároku 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená promotorová sekvence genu je promotorový gen lox-1 ječmene nebo jeho část.

16. Zrno nebo rostlina z potomstva vyprodukovaná z rostliny ječmene nebo její části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15.

17. Rostlinný produkt vyrobený z rostliny ječmene nebo její části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15 nebo ze zrna nebo rostliny z potomstva podle nároku 16.

18. Rostlinný produkt podle nároku 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že produktem je slad.

19. Nápoj připravený za použití rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 17 až 18.

20. Pivo vyrobené za použití rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 17 až 18.

21. Použití rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 17 až 18 pro přípravu nápoje, který představuje organoleptické

kvality, které zůstávají stabilní po měřené časové období nebo při zvýšených teplotách skladování ve srovnání s nápojem připraveným z rostlinného produktu z nemutované kontrolní rostliny nebo její části.

22. Použití rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18 pro přípravu nápoje.

23. Použití rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18 pro výrobu sladu nebo piva.

24. Použití rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18 pro stabilizaci organoleptických vlastností produktu získaného vařením po měřené časové období ve srovnání s kontrolním produktem získaným vařením vyrobeným za použití nemutované rostliny ječmene nebo její části, nemutovaného zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu.

25. Použití rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18 pro výrobu produktu získaného vařením, který po měřené časové období nebo za podmínek zvýšené skladovací teploty vykazuje snížené hladiny volného trans-2-nonenalu ve srovnání s kontrolním produktem získaným vařením vyrobeným za použití nemutované rostliny ječmene nebo její části, nemutovaného zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu.

26. Nápoj vyrobený z rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že po měřené časové období nebo za podmínek zvýšené skladovací teploty vykazuje snížený obsah trans-2-nonenalu ve srovnání s kontrolním nápojem vyrobeným z nemutované rostliny ječmene nebo její části, nemutovaného zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu.

27. Nápoj podle nároku 26, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nápojem je pivo.

D O P L N Ě N Ě P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

1. Rostlina ječmene nebo její část obsahující mutovaný protein LOX-1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že aktivita LOX-1 v uvedené rostlině nebo části rostliny je snížena nebo chybí ve srovnání s nemutovanou kontrolní rostlinou nebo její částí.
2. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že aktivita LOX-1 zahrnuje katalýzu oxidace volných nebo esterifikovaných polynenasycených mastných kyselin a polynenasycených oktadekanových mastných kyselin na formu derivátů 9-hydroperoxy mastné kyseliny.
3. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že protein LOX-1 je kódován pomocí mutované sekvence nukleové kyseliny lox-1, která obsahuje jednu nebo více mutací.
4. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 3, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jedna nebo více mutací je způsobena chemickou mutagenezí nebo ozařováním.
5. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 3 nebo 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená jedna nebo více mutací je/jsou způsobené místně cílenou mutagenezí.
6. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 3 nebo 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jedna nebo více mutací

jsou umístěny v promotorové nebo přepisované oblasti sekvence nukleové kyseliny lox-1.

7. Rostlina ječmene nebo její část podle kteréhokoliv z nároků 3 až 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že mutace je nukleotidovou substitucí v pozici +2347 genu lox-1.

8. Rostlina ječmene nebo její část podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený mutovaný protein LOX-1 obsahuje kyselé, bazické nebo polární substituce aminokyseliny v jedné nebo více konzervovaných neutrálních nebo hydrofóbních zbytcích aminokyseliny, které vyplňují kavitu substrátu LOX-1 ze standardního typu ječmene.

9. Rostlina ječmene nebo její část podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený mutovaný protein LOX-1 obsahuje nekonzervativní substituce aminokyseliny v jednom nebo více z následujících zbytků aminokyseliny z LOX-1 standardního typu ječmene: Y224, L268, W355, E364, G368, V369, N370, I374, L424, L499, K501, A502, V504, D508, S509, H512, Q513, L514, H517, W518, H522, I556, L559, A560, L564, I565, I570, T574, S585, Q715, Y718, N724, R725, P726, T727, L772 a I862.

10. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 9, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený mutovaný protein LOX-1 obsahuje sekvenční aminokyseliny zobrazenou jako sekvence identifikační číslo: 12, ve které Xaa je kyselá, bazická nebo polární aminokyselina.

11. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 10, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že Xaa je glutamová kyselina nebo aspartová kyselina.

12. Rostlina ječmene nebo její část podle nároku 11, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že Xaa je aspartová kyselina.

13. Rostlina ječmene nebo její část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že mutovaný protein LOX-1 obsahuje nekonzervativní substituci aminokyseliny v jednom nebo více z následujících zbytků aminokyseliny z LOX-1 standardního typu ječmene: H₅₁₇, H₅₂₂, H₇₀₈, N₇₁₂ a I₈₆₂.

14. Rostlina ječmene nebo její část podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že mutovaný protein LOX-1 obsahuje nekonzervativní substituci aminokyseliny v jednom nebo více z následujících zbytků aminokyseliny z LOX-1 standardního typu ječmene: H₂₆₁, H₅₁₂, H₇₇₅, F₂₅₉, F₂₆₇, F₇₁₃, W₅₁₈, R₅₅₁, R₇₂₅, D₇₇₈ a K₂₇₃.

15. Transgenická rostlina ječmene nebo její část obsahující heterologní sekvenci nukleové kyseliny exprimující antimediatorovou sekvenci do při nejmenším části přepisované oblasti genu lox-1 ječmene, přičemž heterologní sekvence je nahodile připojena k promotorové sekvenci genu a terminátorové sekvenci transkripce.

16. Transgenická rostlina ječmene nebo její část podle nároku 15, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený promotorový gen řídí konstitutivní expresi antimediatorové sekvence.

17. Transgenická rostlina ječmene nebo její část podle nároku 15 nebo 16, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený promotorový gen řídí tkánově-specifickou nebo dočasně

regulovanou expresi nahodile připojené antimediatorové sekvence v tkáních rostliny.

18. Transgenická rostlina ječmene nebo její část podle nároku 17, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená tkáň je vyvíjející se, klíčící nebo plně vyvinutou zárodečnou tkání.

19. Transgenická rostlina ječmene nebo její část podle nároku 18, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená promotorová sekvence genu je promotorový gen lox-1 ječmene nebo jeho část.

20. Zrno nebo rostlina z potomstva vyprodukovaná z rostliny ječmene nebo její části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 19.

21. Rostlinný produkt vyprodukovaný z rostliny ječmene nebo její části podle kteréhokoliv z nároků 1 až 19 nebo ze zrna nebo rostliny z potomstva podle nároku 20.

22. Rostlinný produkt podle nároku 21, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že produktem je slad.

23. Nápoj připravený za použití rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 21 až 22.

24. Pivo vyrobené za použití rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 21 až 22.

25. Použití rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 21 až 22 pro přípravu nápoje, který předvádí organoleptické kvality, které zůstávají stabilní po měřené časové období nebo při zvýšených teplotách skladování ve srovnání s nápojem

připraveným z rostlinného produktu z nemutované kontrolní rostliny nebo její části.

26. Použití rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 22 pro přípravu nápoje.

27. Použití rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 22 pro výrobu sladu nebo piva.

28. Použití rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 22 pro stabilizaci organoleptických vlastností uvařeného produktu po měřené časové období ve srovnání s kontrolním vařeným produktem vyrobeným za použití nemutované rostliny ječmene nebo její části, nemutovaného zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu.

29. Použití rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 22 pro výrobu produktu získávaného vařením, který po měřené časové období nebo za podmínek zvýšené skladovací teploty vykazuje snížené hladiny volného trans-2-nonenalu ve srovnání s kontrolním produktem získávaným vařením vyrobeným za použití nemutované rostliny ječmene nebo její části, nemutovaného zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu.

30. Nápoj vyrobený z rostliny ječmene nebo její části, zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 22, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že po měřené časové období nebo za podmínek zvýšené

skladovací teploty vykazuje snížený obsah trans-2-nonenalu ve srovnání s kontrolním nápojem vyrobeným z nemutované rostliny ječmene nebo její části, nemutovaného zrna nebo rostliny z potomstva nebo rostlinného produktu.

31. Nápoj podle nároku 26, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nápojem je pivo.

32. Způsob pro výrobu piva z ječmene, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že ječmen nebo jeho část obsahuje mutovaný protein LOX-1, ve kterém aktivita LOX-1 uvedené rostliny nebo její části je snížená nebo chybí ve srovnání s nemutovaným kontrolním ječmenem nebo jeho částí.

33. Způsob podle nároku 32, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený mutovaný protein LOX-1 obsahuje kyselou, bazickou nebo polární substituci aminokyseliny v jednom nebo více konzervovaných neutrálních nebo hydrofóbních zbytcích aminokyseliny vyplňujících kavitu substrátu LOX-1 standardního typu ječmene.

34. Způsob podle nároku 32 nebo 33, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedený mutovaný protein LOX-1 obsahuje nekonzervativní substituce aminokyseliny v jednom nebo více z následujících zbytků aminokyseliny z LOX-1 standardního typu ječmene: Y224, L268, W355, E364, G368, V369, N370, I374, L424, L499, K501, A502, V504, D508, S509, H512, Q513, L514, H517, W518, H522, I556, L559, A560, L564, I565, I570, T574, S585, Q715, Y718, N724, R725, P726, T727, L772 a I862.

35. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 32 až 34, **v y z n a - č u j í c í s e t í m**, že uvedený mutovaný protein LOX-1 obsahuje sekvenci aminokyseliny zobrazenou jako sekvence

identifikační číslo: 12, ve které Xaa je kyselá, bazická nebo polární aminokyselina.

36. Způsob podle nároku 35, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že Xaa je glutamová kyselina nebo aspartová kyselina.

37. Způsob podle nároku 36, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že Xaa je aspartová kyselina.

38. Způsob podle nároku 32, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že mutovaný protein LOX-1 obsahuje nekonzervativní substituci aminokyseliny v jednom nebo více z následujících zbytků aminokyseliny z LOX-1 standardního typu ječmene: H₅₁₇, H₅₂₂, H₇₀₈, N₇₁₂ a I₈₆₂.

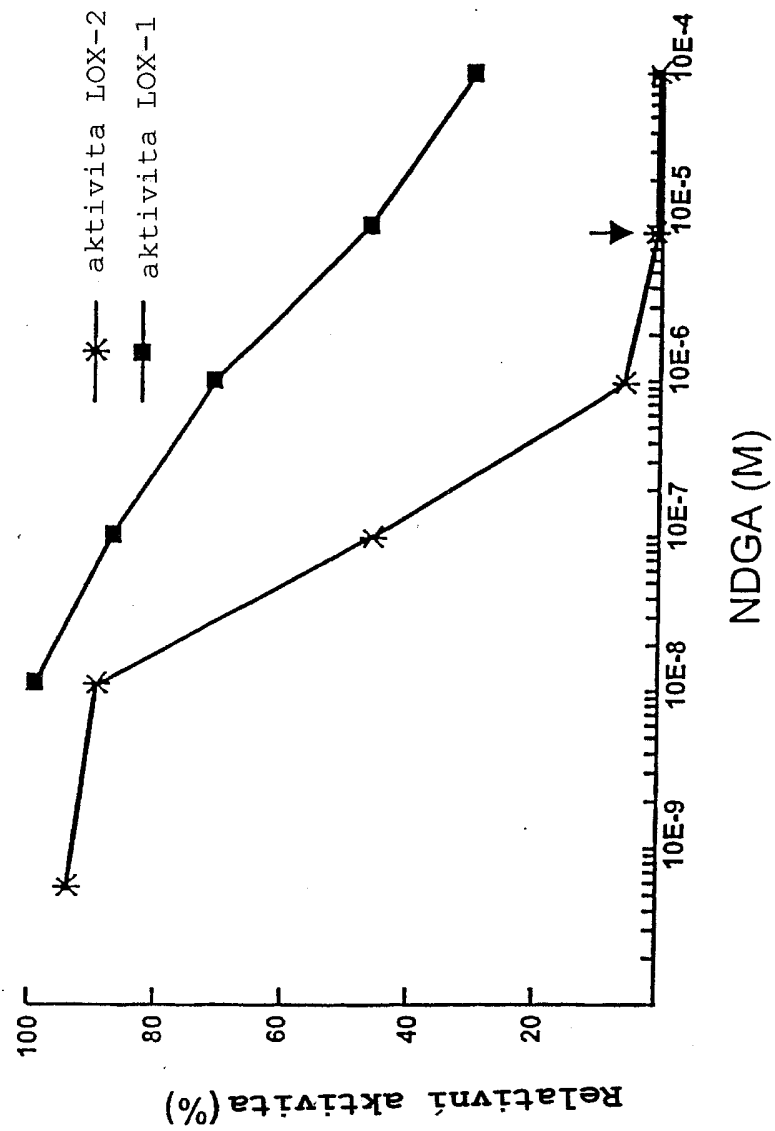
39. Způsob podle nároku 32, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že mutovaný protein LOX-1 obsahuje nekonzervativní substituci aminokyseliny v jednom nebo více z následujících zbytků aminokyseliny z LOX-1 standardního typu ječmene: H₂₆₁, H₅₁₂, H₇₇₅, F₂₅₉, F₂₆₇, F₇₁₃, W₅₁₈, R₅₅₁, R₇₂₅, D₇₇₈ a K₂₇₃.

12.09.03

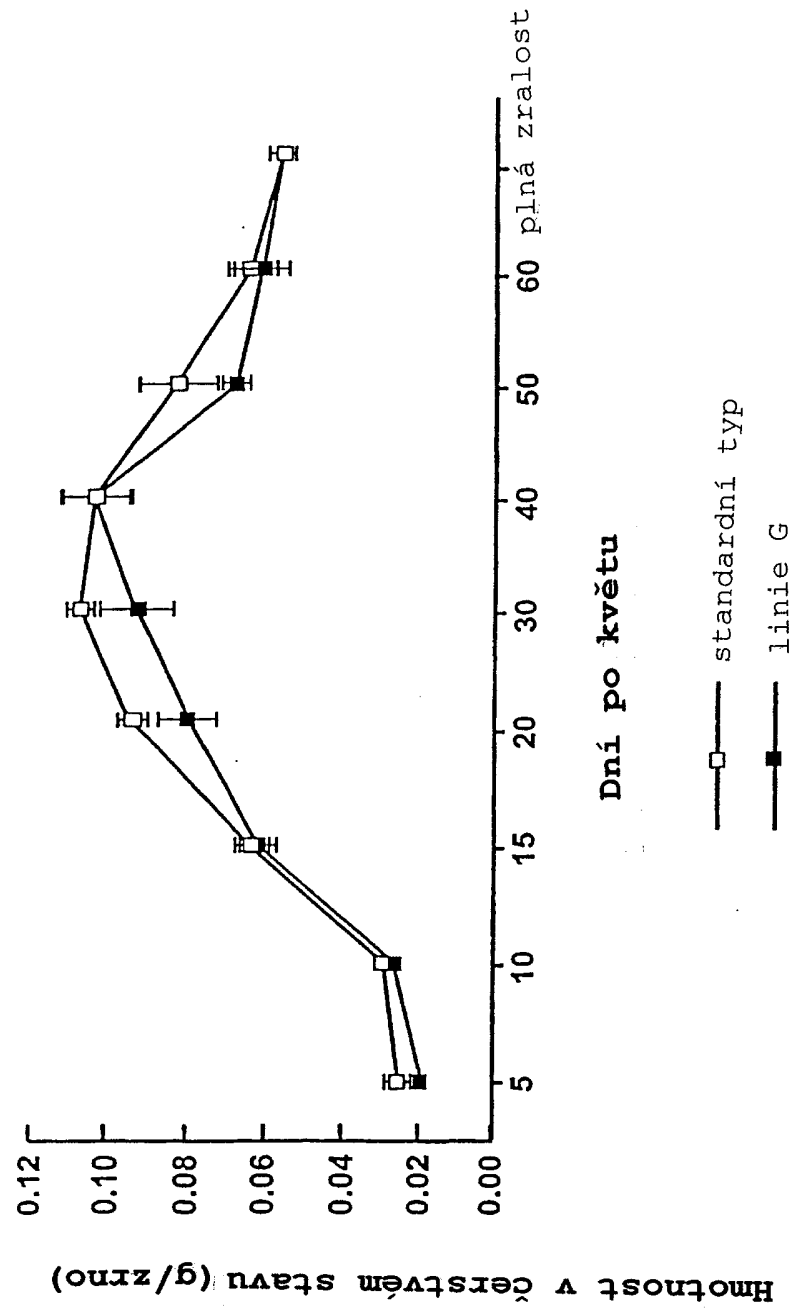
PV2003-1872

64688

Obr. 1

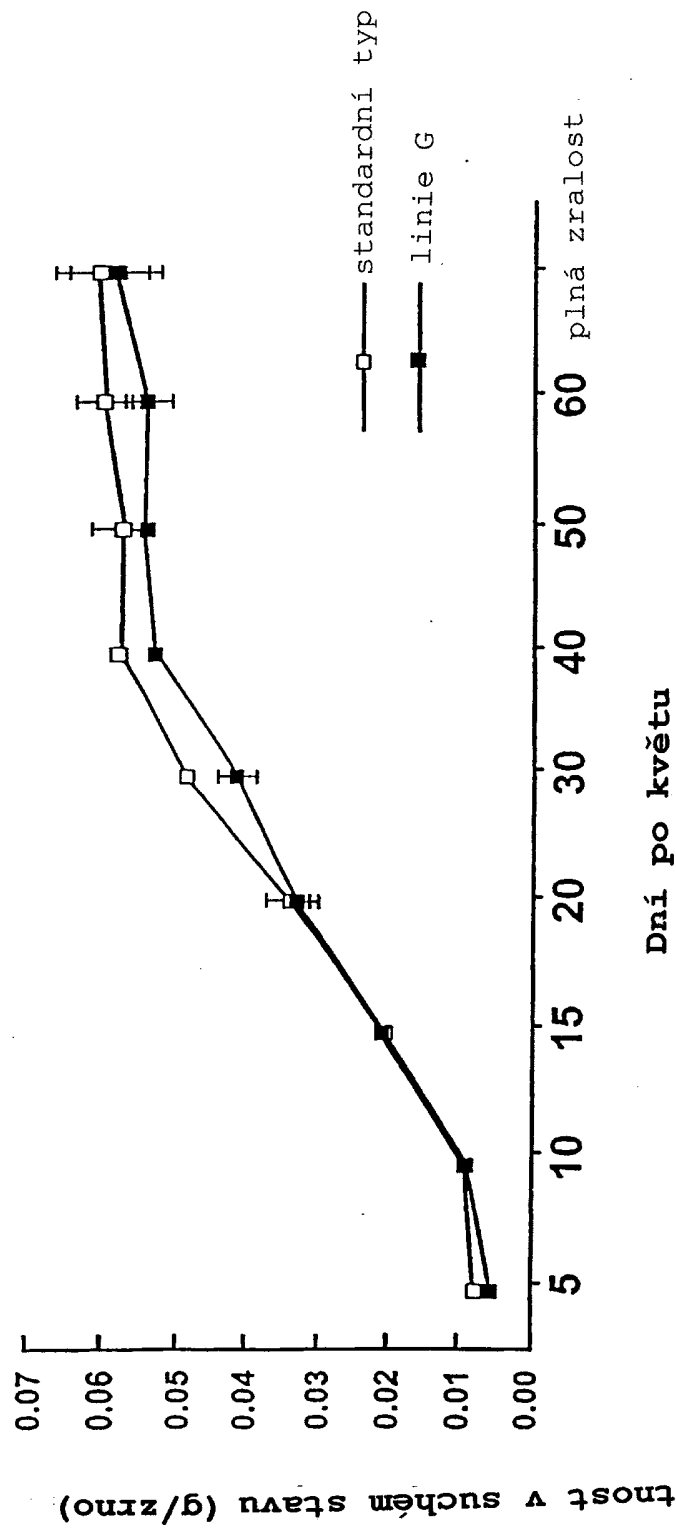


Obr. 2



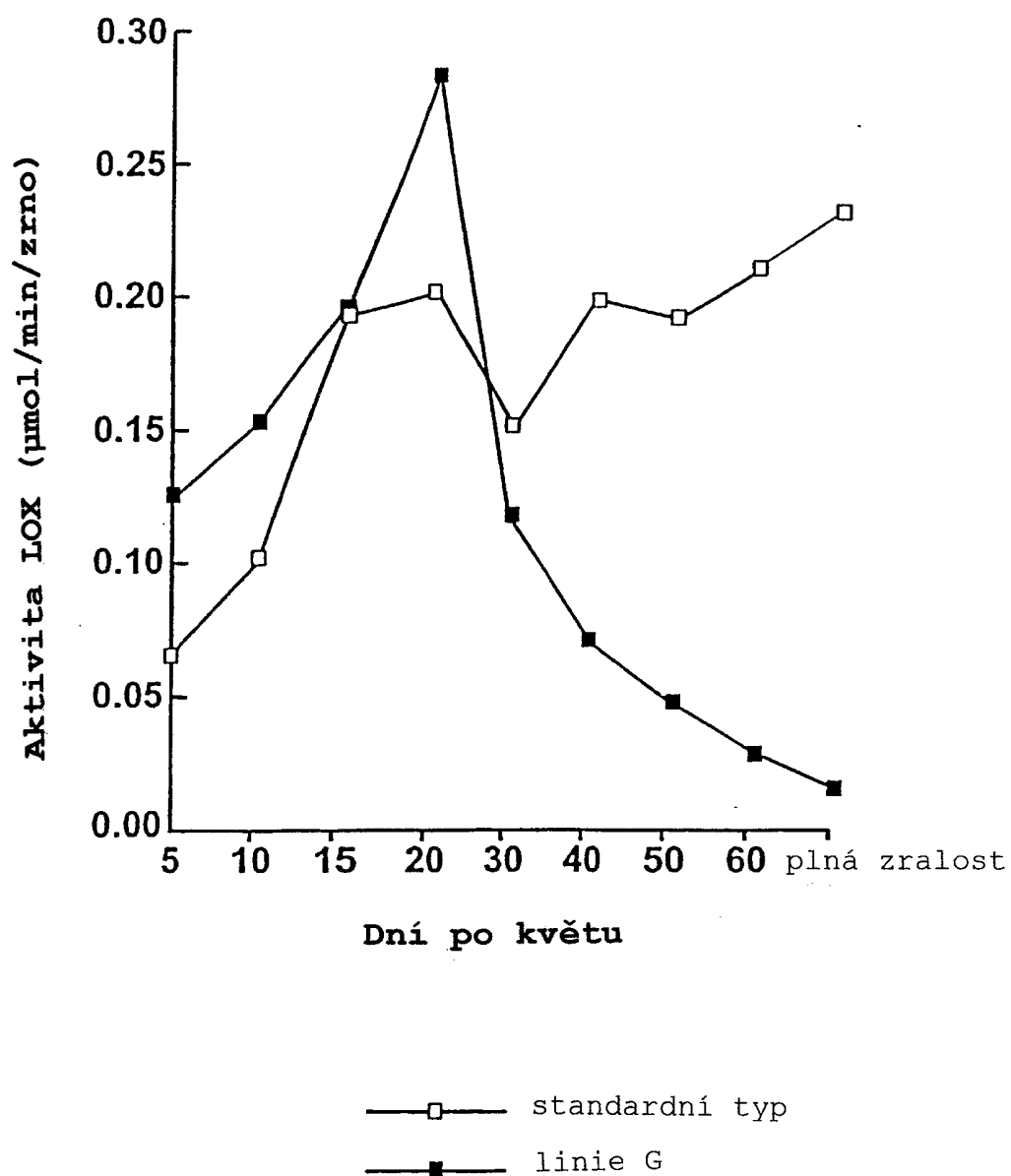
00.09.03

Obr. 3



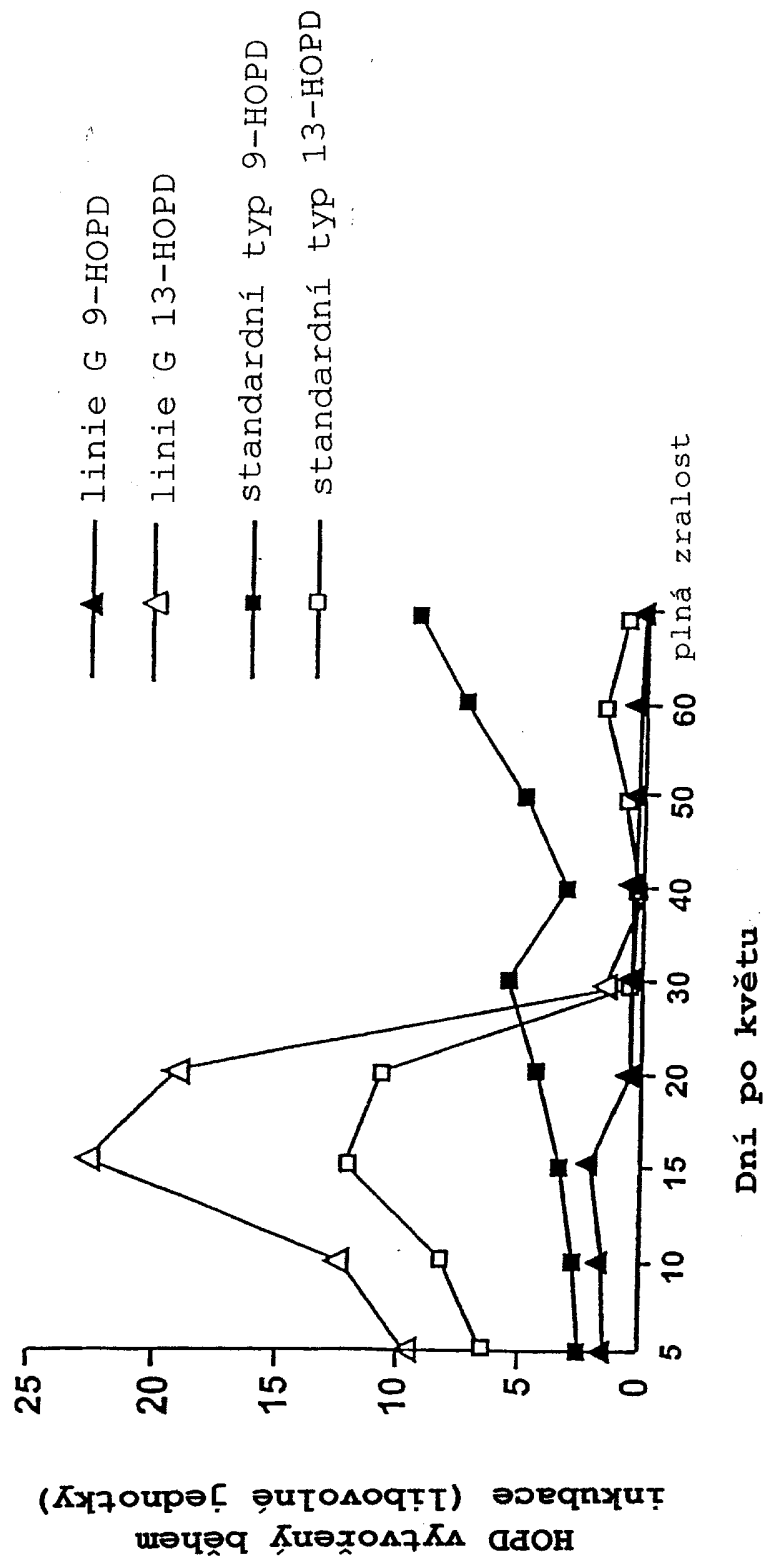
12.09.03

Obr. 4



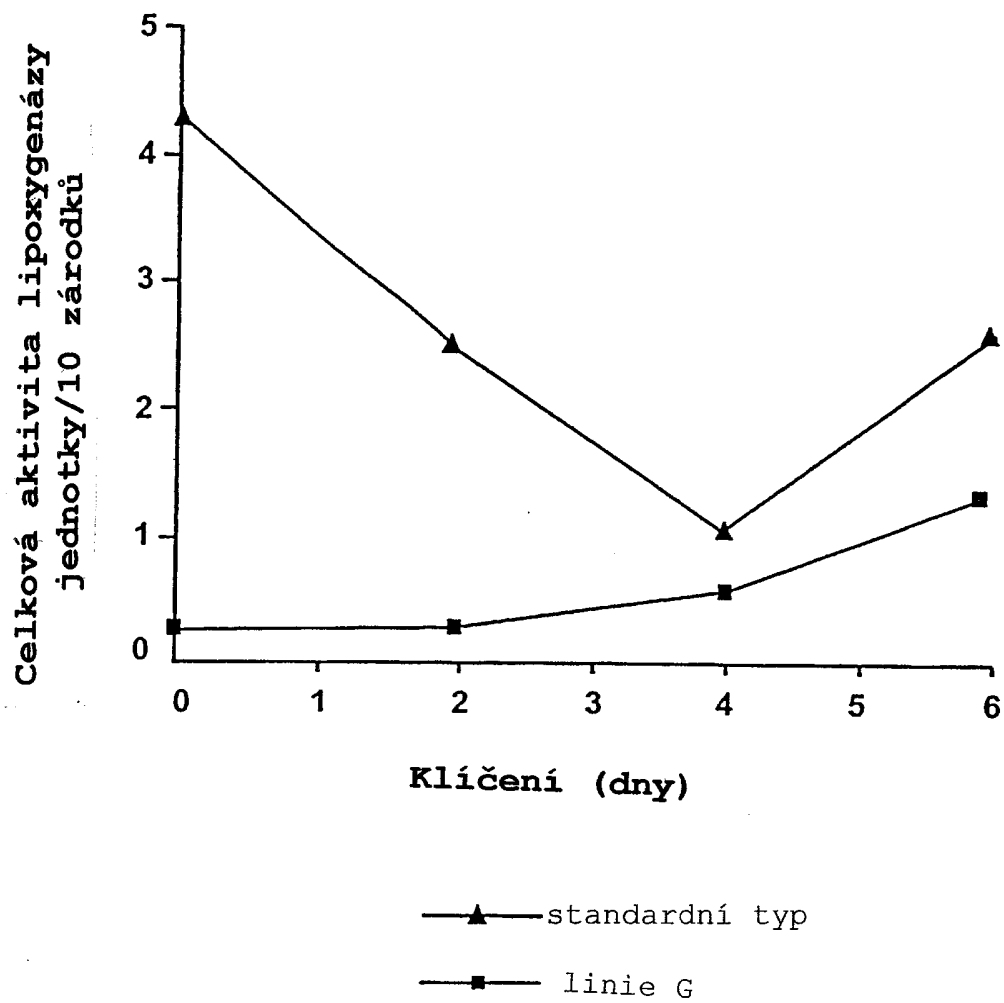
12.09.03

Obr. 5

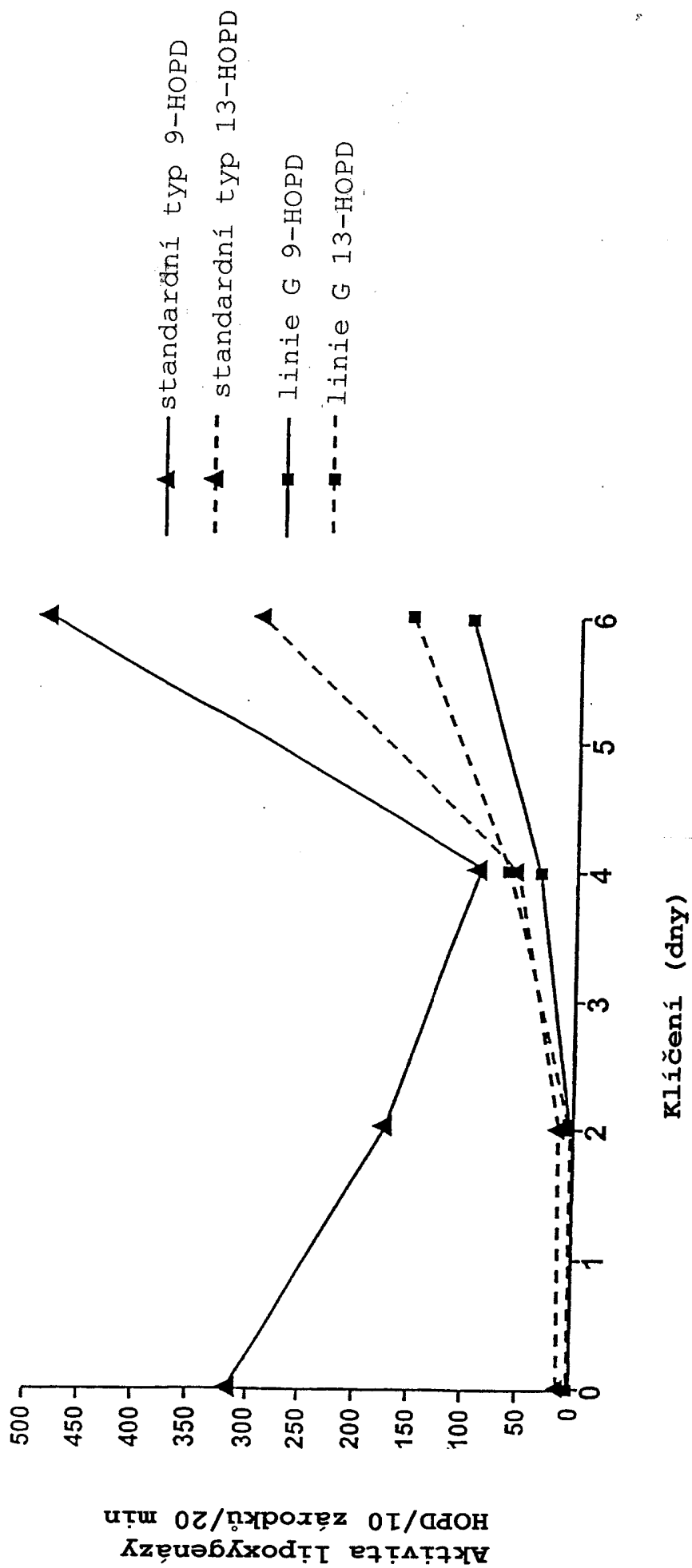


12.09.03

Obr. 6

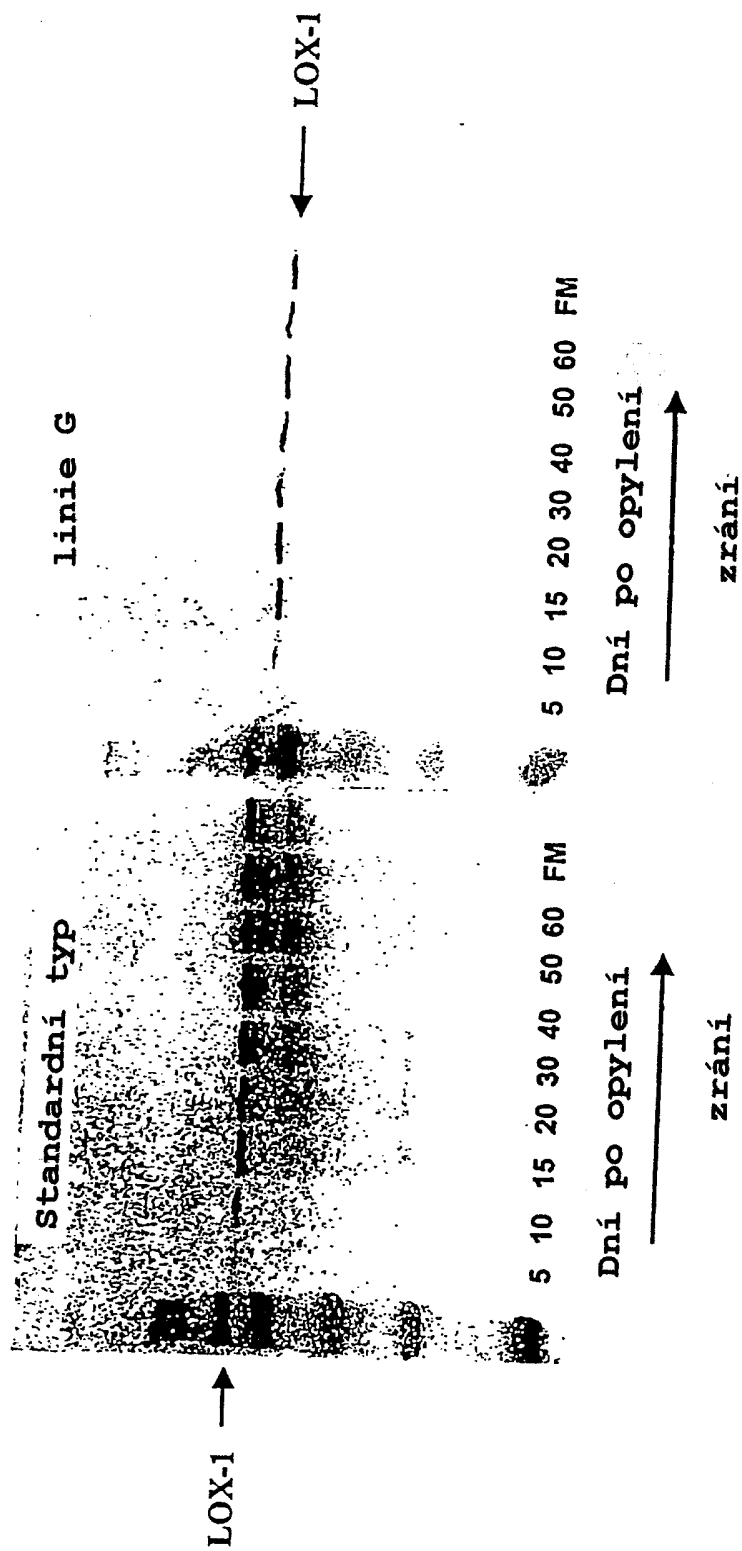


Obr. 7



12.09.03

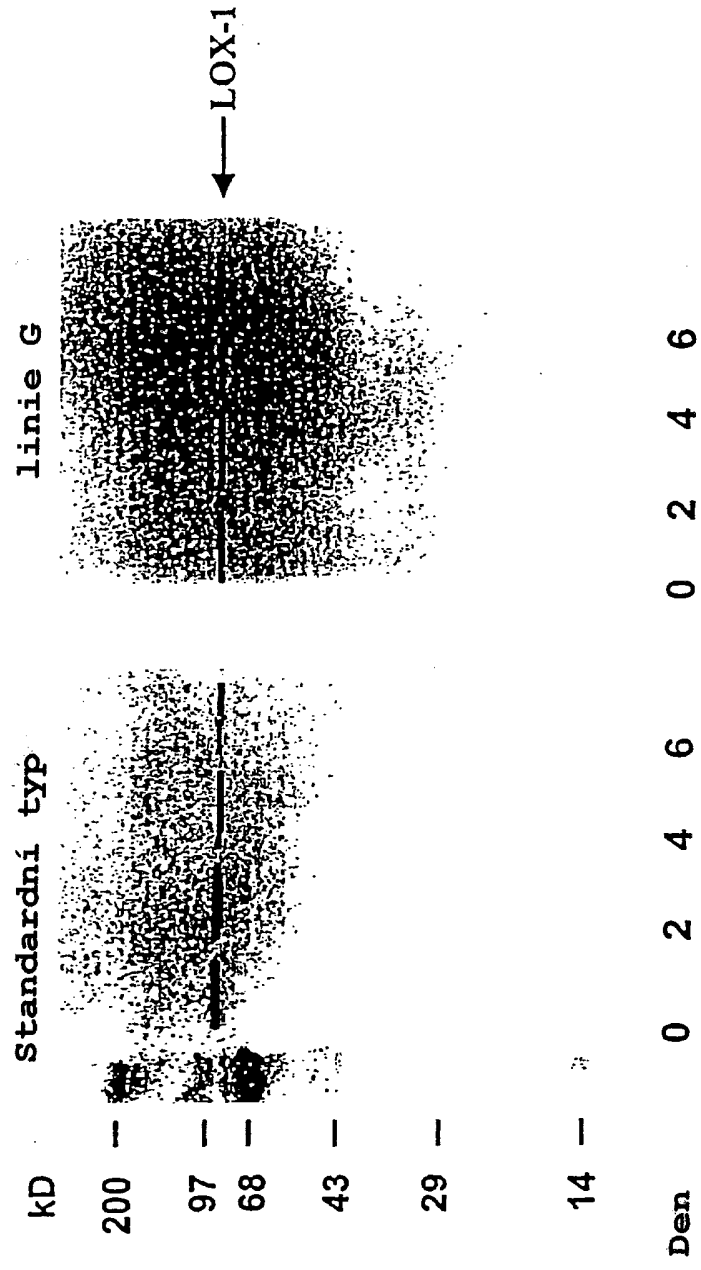
Obr. 8



10.09.03

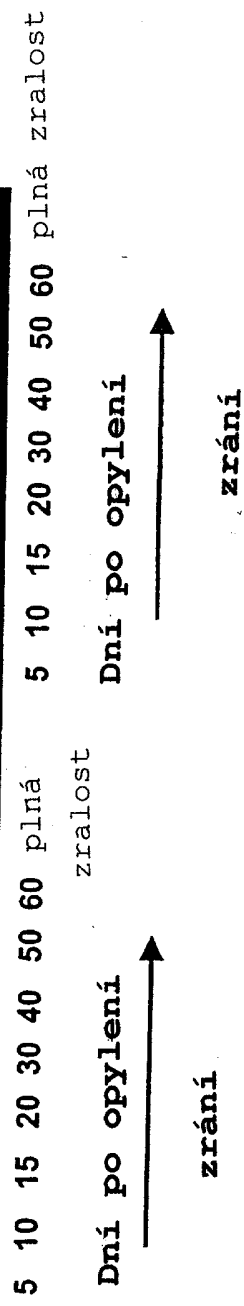
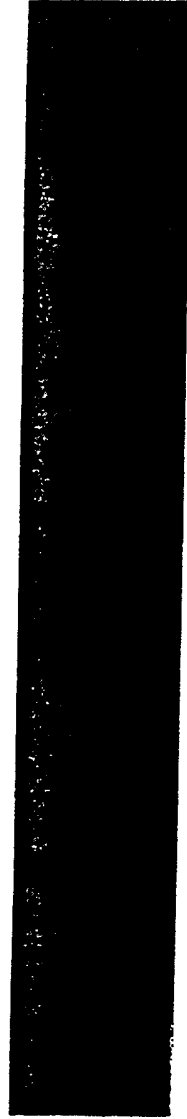
12.09.03

Obr. 9



Obr. 10

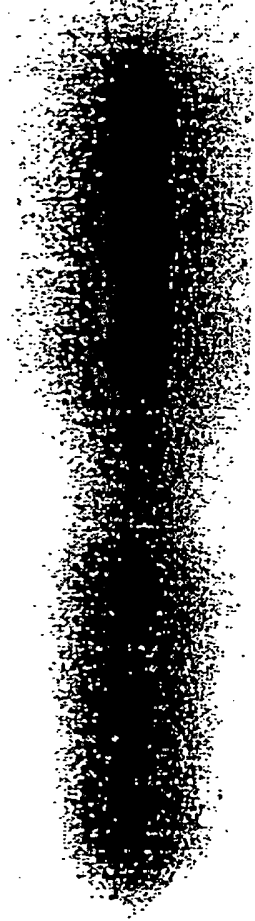
Standardní typ linie G



10.09.03

Obr. 11

Standardní typ linie G



Dny 0 2 4 6 0 2 4 6

12.09.03

Obr. 12A

(-288) Promotor

linie G - LG CAGCCCCCATGCAATGCACATGCACATGCAGTGCAGCCAAAGCACCGCTCGATGGCGGATCACCCGTCACG -208
standardní typ -WT CAGCCCCCATGCAATGCACATGCACATGCAGTGCAGCCAAAGCACCGCTCGATGGCGGATCACCCGTCACG

LG GGACCGGAGCGGCCATGCGAAGCACGAGGAGGCGACGTCACCGTCCGGCGGAGCACGTTGGAGAGCACGTCGCCGTCGG -128
WT GGACCGGAGCGGCCATGCGAAGCACGAGGAGGCGACGTCACCGTCCGGCGGAGCACGTTGGAGAGCACGTCGCCGTCGG

LG ATCCATCTCTCCAAAGCCGAGGCCACACCGGGACCGGACCGGCTATAAATTGCCGGACCGAGCTGCAA -48
WT ATCCATCTCTCCAAAGCCGAGGCCACACCGGGACCGGACCGGCTATAAATTGCCGGACCGAGCTGCAA

Počáteční místo transkripce (+1)

LG GCAGTCTCTACACACTCACGCAACACATCCATCTTCACTGAAAAGTGAAAAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG 32
WT GCAGTCTCTACACACTCACGCAACACATCCATCTTCACTGAAAAGTGAAAAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG

Počáteční místo translate (+69) →

LG GAGCAGTGAAAGCGAGGAGGAGGAGGCCAAAGAACAAAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTCACGGGGCGGAACAA 112
WT GAGCAGTGAAAGCGAGGAGGAGGAGGCCAAAGAACAAAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTCACGGGGCGGAACAA

LG GAGCGCCCGGCTCAAGGGCACGGTGGTGTCTCATGCGCAAGAACGCTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG 192
WT GAGCGCCCGGCTCAAGGGCACGGTGGTGTCTCATGCGCAAGAACGCTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG.

(tichá mutace) *

LG ACGGCATCGGCGAGTTCTCTCGGCAAGGGTGTCACTGCGCAGCTTATCAGCTCCACCGCGCTCGACCAAGGTAATCACTAC 272
WT ACGGCATCGGCGAGTTCTCTCGGCAAGGGCTCACCTGCCAGCTTATCAGCTCCACCGCGCTCGACCAAGGTAATCACTAC

LG CCTCCTCCGGCCTTCTCCTCTGTTTACAAGATATAGTATTTCTTCTGTGGCCGGCGCCATGGATGGATGTGT 352
WT CCTCCTCCGGCCTTCTCCTCTGTTTACAAGATATAGTATTTCTTCTGTGGCCGGCGCCATGGATGGATGTGT



Obr. 12B

linie G - LG CTGGATCGGCTAAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCTTTTACCTGAGCATGGGCATATATGCCATCGAAAAAA 432
 standardní typ - WT CTGGATCGGCTAAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTCTTTTACCTGAGCATGGGCATATATGCCATCGAAAAAA

LG GAGACAACAGCATGTCATGGTGGCGCACCAAGCAGAGCACCGGATGCTCGAGACAAAGCAACACAAAGC 512
 WT GAGACAACAGCATGTCATGGTGGCGCACCAAGCAGAGCACCGGATGCTCGAGACAAAGCAACACAAAGC

LG AAGGACGACACGTCAAAAGCAACACAACAGCAAGGACGGCACGTCAAAAGCAACACAACCTTAAAGCACAAGA 592
 WT AAGGACGACACGTCAAAAGCAACACAACAGCAAGGACGGCACGTCAAAAGCAACACAACCTTAAAGCACAAGA

LG CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTTCATCAAAAAACAACGCTGGAAGAGAGAGAGAGAA 672
 WT CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTTCATCAAAAAACAACGCTGGAAGAGAGAGAGAGAA

LG GTAGTAGCCATGAAAAATTAATCACCAGGCGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGTACGTGGCATGTATAG 752
 WT GTAGTAGCCATGAAAAATTAATCACCAGGCGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGTACGTGGCATGTATAG

LG TTCTTGTAAGTAACTAAGCATGTGATATGAGAAGGTACGTGGTGCAGACAAACGGGTCGCGGGAAGGTGGCGCG 832
 WT TTCTTGTAAGTAACTAAGCATGTGATATGAGAAGGTACGTGGTGCAGACAAACGGGTCGCGGGAAGGTGGCGCG

LG GAGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGACGACGGGGAGTCCAAAGTTCCGCCCTCACCTTCGACTG 912
 WT GAGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGACGACGGGGAGTCCAAAGTTCCGCCCTCACCTTCGACTG

LG GGAGGTGGAGAAAGCTCGGGGTGCCGGCGCCCATCGTCTCAACAACTACCACAGCTCCGAGTTCCTGCTTAAACCATCA 992
 WT GGAGGTGGAGAAAGCTCGGGGTGCCGGCGCCCATCGTCTCAACAACTACCACAGCTCCGAGTTCCTGCTTAAACCATCA

LG CCTTCCACGACGTCCCCGGCCGAGGGCAACCTCACCTTCGTGCGCAACTCATGGATCTACCCCGCCGCAACTACCGA 1072
 WT CCTTCCACGACGTCCCCGGCCGAGGGCAACCTCACCTTCGTGCGCAACTCATGGATCTACCCCGCCGCAACTACCGA

Obr. 12C

linie G - LG TACAGCCGCGTCTTCTTCGCCAACGACGTCGTCGGATTTTCCTCTACTTTTCCTCTCCTTTTCATTTTACCGCCTTCGTCA 1152
 standardní typ - WT TACAGCCGCGTCTTCTTCGCCAACGACGTCGTCGGATTTTCCTCTACTTTTCCTCTCCTTTTCATTTTACCGCCTTCGTCA

LG TTCATGGTCGATCATTAAGTCTTGGCAGGACAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACCTTAGCAGTACGTACATTAT 1232
 WT TTCATGGTCGATCATTAAGTCTTGGCAGGACAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACCTTAGCAGTACGTACATTAT

LG TTATTCCGTGTTGGTAGAAAAGGATATGGTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAGTTGCCACCGTGGCACCGTG 1312
 WT TTATTCCGTGTTGGTAGAAAAGGATATGGTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAGTTGCCACCGTGGCACCGTG

LG GCAGCGTGGTAGGTGAAAAATAACTGTTGCACGGATCCACCACATGATTGTTTTCATGAATAAACTTTTAAAGGATGTGT 1392
 WT GCAGCGTGGTAGGTGAAAAATAACTGTTGCACGGATCCACCACATGATTGTTTTCATGAATAAACTTTTAAAGGATGTGT

LG CTAGCCACATCTAGATGTCATGTCACATAAATTATTGCATACCAAACGATTAAATTAAGCATAAAAAGGAAAAAAA 1472
 WT CTAGCCACATCTAGATGTCATGTCACATAAATTATTGCATACCAAACGATTAAATTAAGCATAAAAAGGAAAAAAA

LG TACTCACATATCTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTCAT 1552
 WT TACTCACATATCTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATATTTATCTTACATCTAAACCTTTCTTCAT

LG TCTTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTCACTATGGACAACATACGAAACAAAATCAGTGGATCTCTATGCAATTCATT 1632
 WT TCTTAAATATAAGACATTTGTAAGATTTCACTATGGACAACATACGAAACAAAATCAGTGGATCTCTATGCAATTCATT

LG ATGTAGTCTATAATAAAATCTTTAAAGATCGTATATTTTGCAACGGAGGGAGTAAACATAACTTTTAAATAGTAATGT 1712
 WT ATGTAGTCTATAATAAAATCTTTAAAGATCGTATATTTTGCAACGGAGGGAGTAAACATAACTTTTAAATAGTAATGT

Obr. 12D

linie G - LG TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACCTGCCGAGCCAGATGCCGGCGCGCTGAAGCCGTACCCGCGACGACGAGCTCCG 1792
standardni typ - WT TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACCTGCCGAGCCAGATGCCGGCGCGCTGAAGCCGTACCCGCGACGACGAGCTCCG

LG GAACCTGCGTGGCGACGACAGAGGGCCCGTACCAGAGACGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAAACGACCTCG 1872
WT GAACCTGCGTGGCGACGACAGAGGGCCCGTACCAGAGACGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAAACGACCTCG

LG GCGAGGGCGCGCCCATCCTCGGGGGAACCTCCGACCAACCTTACCCGCGCGCGCGCACGGAGCGCAAGCCCAACGCC 1952
WT GCGAGGGCGCGCCCATCCTCGGGGGAACCTCCGACCAACCTTACCCGCGCGCGCGCACGGAGCGCAAGCCCAACGCC

LG AGCGACCCGAGCCTGGAGAGCCGGCTGTCGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCGCGGGACGAGAAATTTCGGCCACCTCAA 2032
WT AGCGACCCGAGCCTGGAGAGCCGGCTGTCGCTGCTGGAGCAGATCTACGTGCCGCGGGACGAGAAATTTCGGCCACCTCAA

LG GACGTCCGACTTCTTGGCTACTCCATCAAGGCCATCAGCAGGGCATCTCTGCCGGCGCGTGCACCTACGTGGACACCA 2112
WT GACGTCCGACTTCTTGGCTACTCCATCAAGGCCATCAGCAGGGCATCTCTGCCGGCGCGTGCACCTACGTGGACACCA

LG CCCCCGGCGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCCAAGGTGGCGCCCTG 2192
WT CCCCCGGCGAGTTCGACTCCTTCCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCCAAGGTGGCGCCCTG

LG GAGGAGCTCCGTAAGCAGTTCCCGCTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGTCGGCGGGCGACTCCCTGCTTAAGCTCCC 2272
WT GAGGAGCTCCGTAAGCAGTTCCCGCTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGTCGGCGGGCGACTCCCTGCTTAAGCTCCC

LG CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAAACAAGCAGGCGGTGGAGGACCGACGAGGAGTTTCGACGGGAGGTGCTCGCCGA CGTCA 2352
WT CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAAACAAGCAGGCGGTGGAGGACCGACGAGGAGTTTCGACGGGAGGTGCTCGCCGGCGTCA
(misto mutace) *

Obr. 12E

linie G - LG ACCGGTCATGATCACGGTCTCACGGTGAGTCAGCGATTATTTGTTTCATTGTGTGTATGGTGTCATGGTGAGAAAAG 2432
standardní typ - WT ACCGGTCATGATCACGGTCTCACGGTGAGTCAGCGATTATTTGTTTCATTGTGTGTATGGTGTCATGGTGAGAAAAG

LG TGCAGATCTTGATTGCGTTGGTTCGCATGACGCATGCTGCATGATGCAGGAGTTCCCGCCAAAAGTAGTCTGGACC 2512
WT TGCAGATCTTGATTGCGTTGGTTCGCATGACGCATGCTGCATGATGCAGGAGTTCCCGCCAAAAGTAGTCTGGACC

LG CTAGCAAGTTTGGTGACCAACAGCAACCATCACGGCGGAGCACATAGAGAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTGACAGCAG 2592
WT CTAGCAAGTTTGGTGACCAACAGCAACCATCACGGCGGAGCACATAGAGAGAACCTCGAGGGCCTCACGGTGACAGCAG

LG GTAATTGGTCCAAAGCCATCGACATCAACTATGATTTACCTAGGAGTAATTGGTAGCTGTAGATAAATTTGGCTTCGTTGCA 2672
WT GTAATTGGTCCAAAGCCATCGACATCAACTATGATTTACCTAGGAGTAATTGGTAGCTGTAGATAAATTTGGCTTCGTTGCA

LG ATTAATTTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAAATTTGCAGGCGCTGAAAAGCAACAGGCTGTACATCC 2752
WT ATTAATTTGATGCTGGCCGATCAAGTGATCGTATTGGGTTTGAAAATTTGCAGGCGCTGAAAAGCAACAGGCTGTACATCC

LG TTGATCACCATGACCGGTTTCATGCCGTTCTCTGATCGACGTCAACAACCTGCCCGGCAACTTCATCTACGCCACGAGGACC 2832
WT TTGATCACCATGACCGGTTTCATGCCGTTCTCTGATCGACGTCAACAACCTGCCCGGCAACTTCATCTACGCCACGAGGACC

LG CTCCTTCTTCTGCGCGGCGACGGCAGGCTCACGCCGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCATCATCCAGGGCGGCCCTTAC 2912
WT CTCCTTCTTCTGCGCGGCGACGGCAGGCTCACGCCGCTCGCCATCGAGCTGAGCGAGCCCCATCATCCAGGGCGGCCCTTAC

LG CACGGCCAAGAGCAAGGTTTACACGCCCGGTGCCAGCGGCTCCGTCTGAAGGCTGGGTGTGGAGCTCGCCAAAGCCCTACG 2992
WT CACGGCCAAGAGCAAGGTTTACACGCCCGGTGCCAGCGGCTCCGTCTGAAGGCTGGGTGTGGAGCTCGCCAAAGCCCTACG

LG TCGCCGTCAATGACTCCGGGTGGCACCCAGCTCGTACGCCACTGGTACGTTCTCCACGGTCGATGTGATTCAAGTCAGTCGA 3072
WT TCGCCGTCAATGACTCCGGGTGGCACCCAGCTCGTACGCCACTGGTACGTTCTCCACGGTCGATGTGATTCAAGTCAGTCGA

Obr. 12F

linie G - LG TGCACAACAACTGATCGAAATATGATTGATTGAAACGGCAGGCTGAACACTCACGGCGTGATGGAGCCGTTTCGTGATCT 3152
standardní typ - WT TGCACAACAACTGATCGAAATATGATTGATTGAAACGGCAGGCTGAACACTCACGGCGTGATGGAGCCGTTTCGTGATCT

LG CGACGAACCCGGCACCTTAGCGTGACGCACCCGGTGCAAAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCATGACCATCAAC 3232
WT CGACGAACCCGGCACCTTAGCGTGACGCACCCGGTGCAAAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCATGACCATCAAC

LG GCGCTGGCGCGCAGACGCTCATCAACGCCGGCGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCGGGGCAAGTTTCGCGTTGGGGAT 3312
WT GCGCTGGCGCGCAGACGCTCATCAACGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCGGGGCAAGTTTCGCGTTGGGGAT

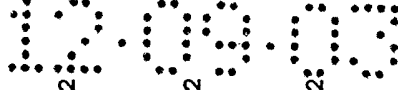
LG GTCGGCCGTGGTGTA CAAGGACTGGAAGTTCA CCGAGCAGGACTGCCGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA 3392
WT GTCGGCCGTGGTGTA CAAGGACTGGAAGTTCA CCGAGCAGGACTGCCGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA

LG AATGTTATGAATGTGTAAACAAATTGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAATGCAGGGGCATGGCGG 3472
WT AATGTTATGAATGTGTAAACAAATTGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAATGCAGGGGCATGGCGG

LG TGGAGGACCCGTCGAGCCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTGTCTGGACTACCCGTACGCGCGGACGGGCTGGCGATCTGG 3552
WT TGGAGGACCCGTCGAGCCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTGTCTGGACTACCCGTACGCGCGGACGGGCTGGCGATCTGG

LG CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGCTGCAGGGCGATACGGAGGT 3632
WT CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGCTGCAGGGCGATACGGAGGT

LG GCAGGGCGTGGTGAAGGAGACCGCGGAGGTGCGGGCACGGCGACCTCAAGGACGCCCCCATGGTGGCCCCAAGATGCAAAGTG 3712
WT GCAGGGCGTGGTGAAGGAGACCGCGGAGGTGCGGGCACGGCGACCTCAAGGACGCCCCCATGGTGGCCCCAAGATGCAAAGTG

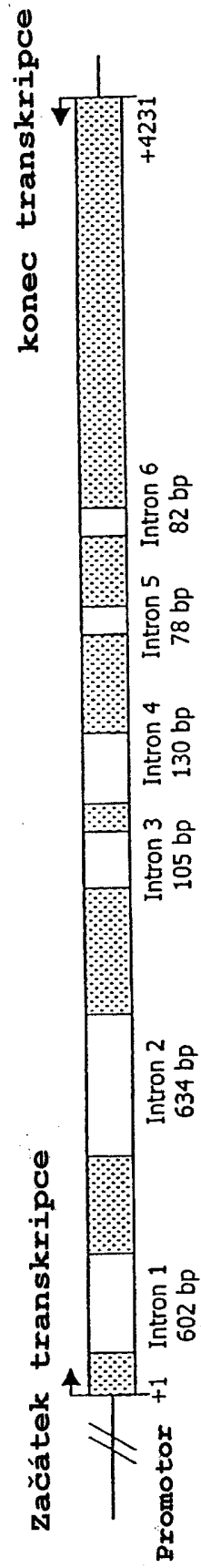


[illegible]

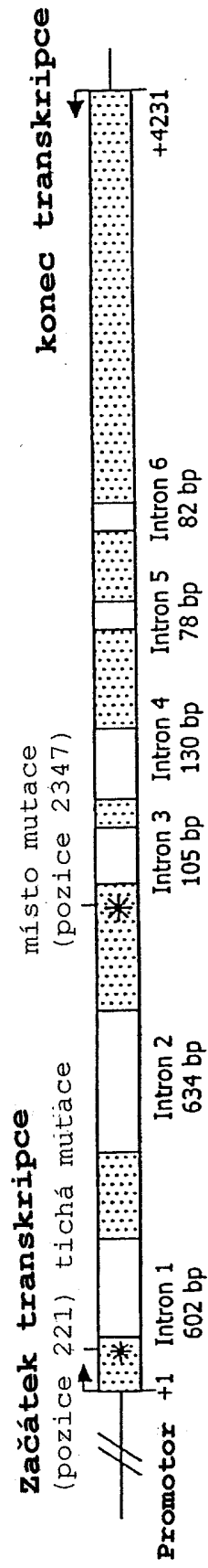
LG ATAAATAAGCAGATTTGCTTCC
WT ATAAATAAGCAGATTTGCTTCC

Obr. 13

Struktura genu LOX-1 standardního typu:



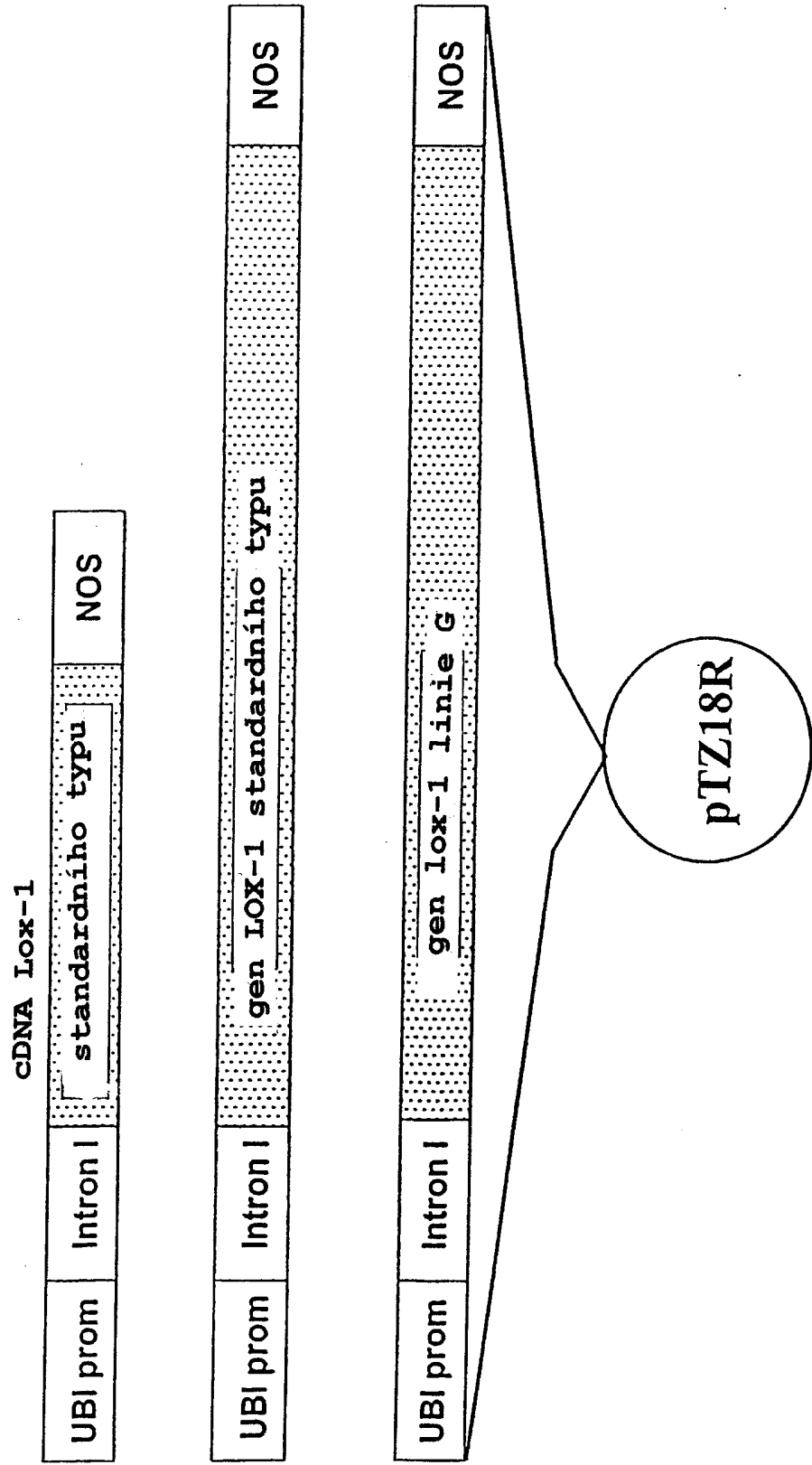
Struktura genu lox-1 linie G:



(bp = párů bází)

0000

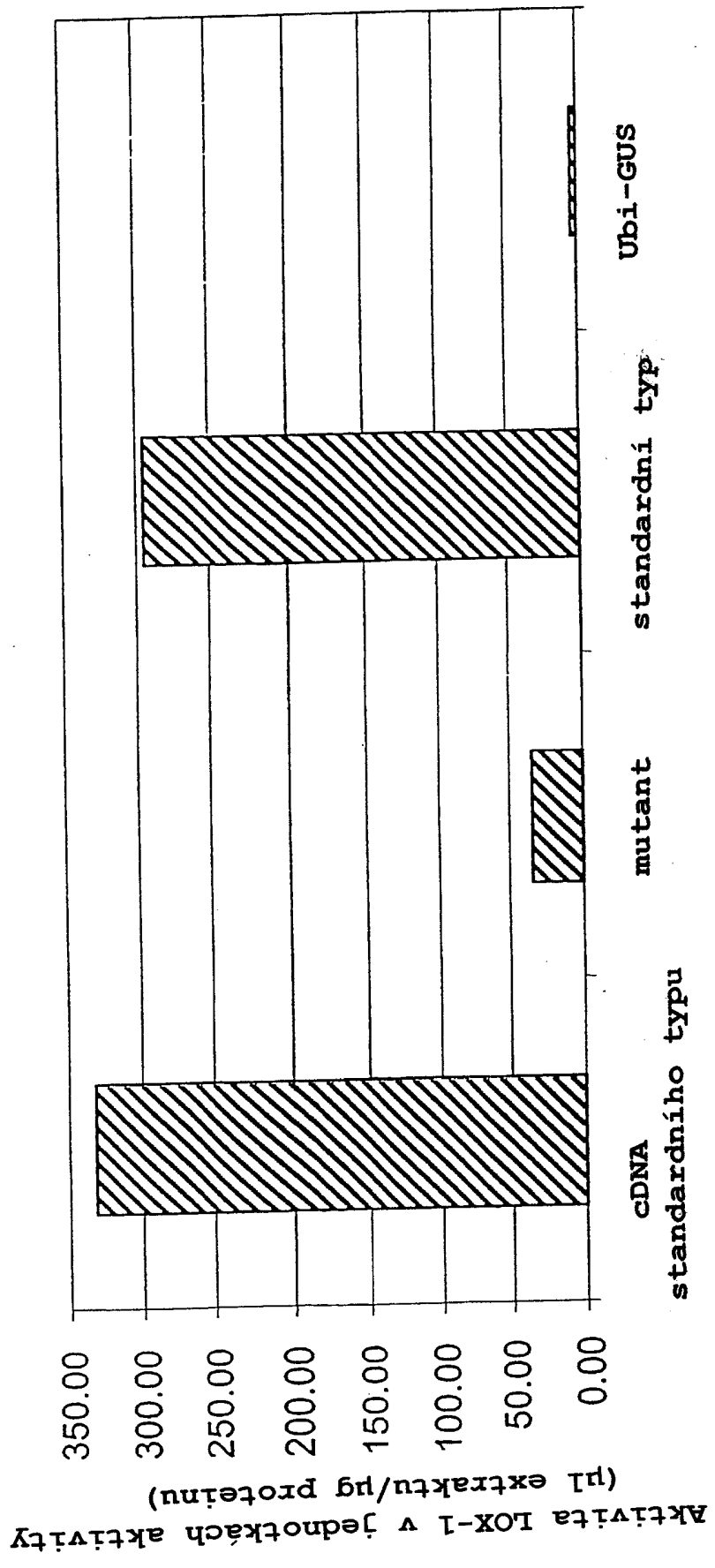
Obr. 14



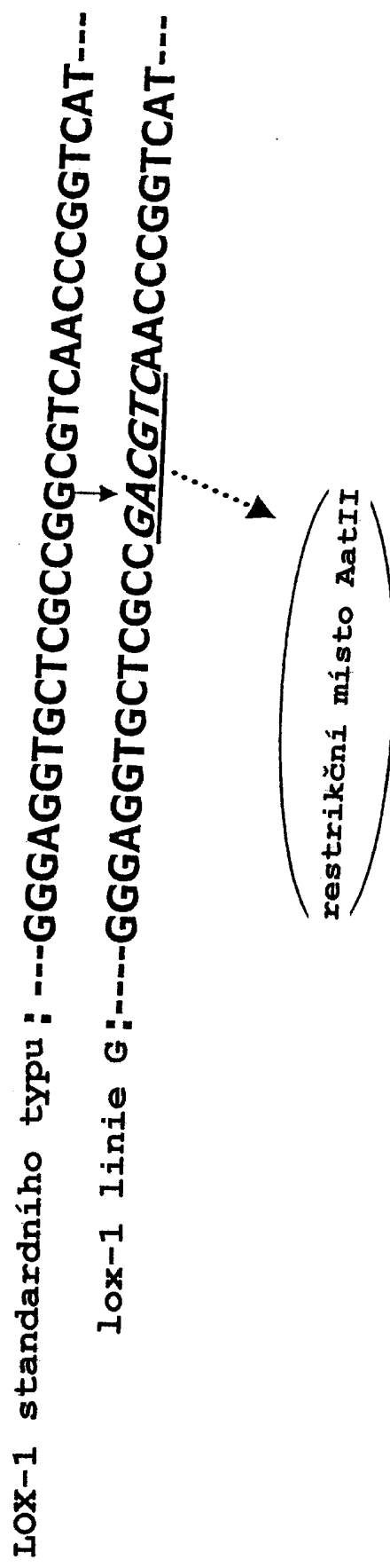
(UBI prom = ubichitinový promotor)

12.09.03

Obr. 15

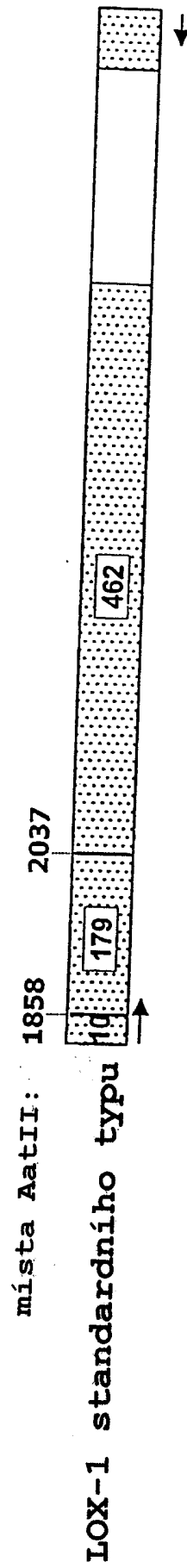
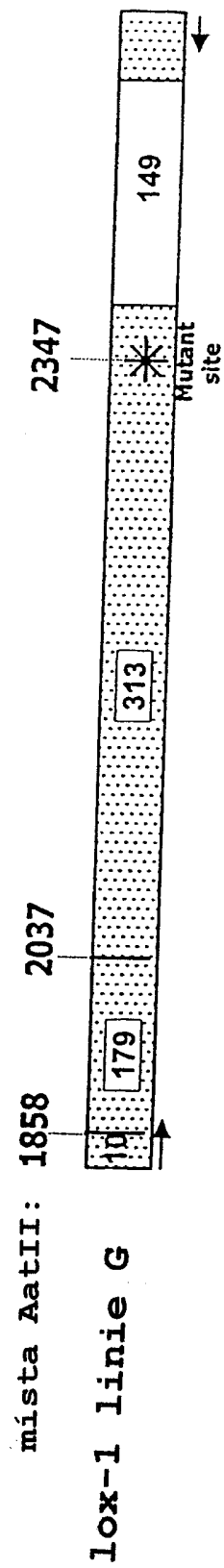


Obr. 16



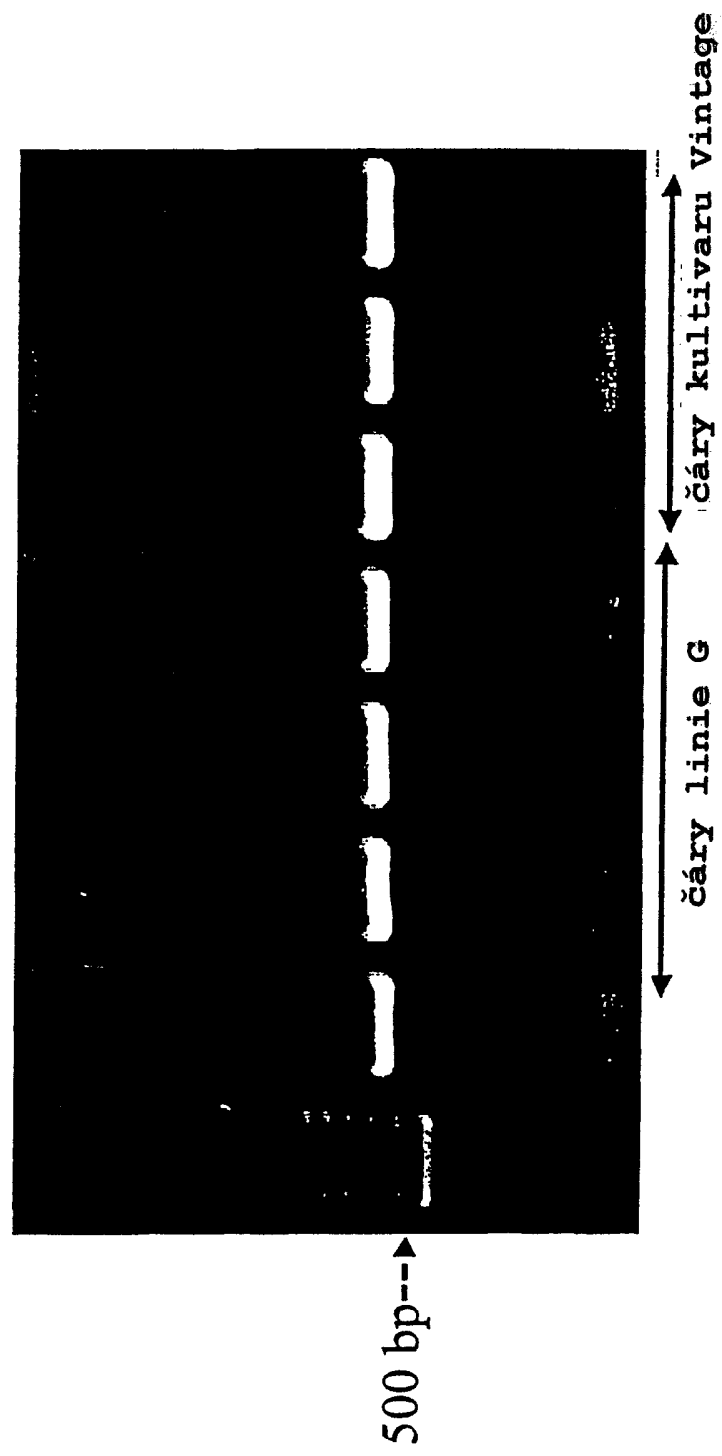
12.09.03

Obr. 17



10.09.03

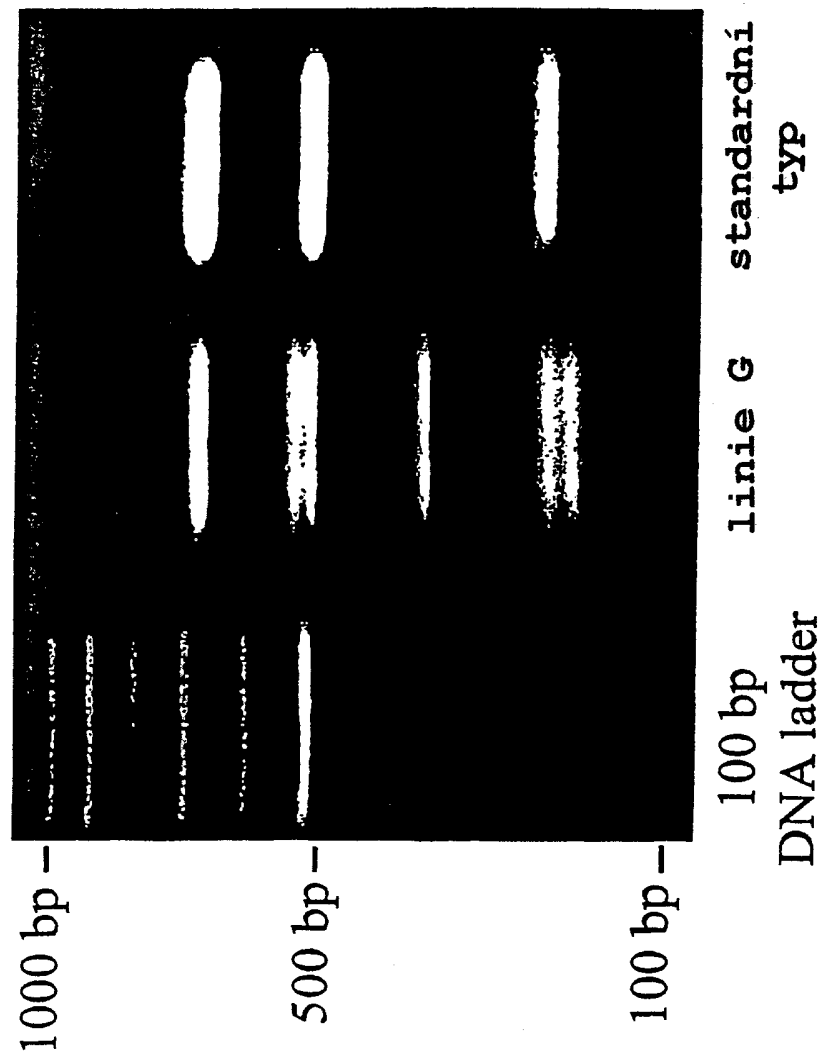
Obr. 18



(bp = párů bází)

12.09.03

Obr. 19



(bp = párů bází)

12.09.03

Obr. 20

Program zpětného křížení pro linii G s kultivarem Alexis

Mateřské
rostliny:

ll x LL

linie G Alexis

Ll

samoopylení

LL a Ll
rostliny
se vyřadí

1 LL: 2 Ll: 1 ll

ll x LL

(50 % základu Alexis)

Alexis

Ll

samoopylení

LL a Ll
rostliny
se vyřadí

1 LL: 2 Ll: 1 ll

ll x LL

(75 % základu Alexis)

Alexis

Pokračování zpětného křížení

Očekávané % Očekávaná Naměřená
Alexis v Ll četnost Ll četnost ll

Mateřské rostliny 0%

Zpětné křížení 1 25%

Zpětné křížení 2 25%

Zpětné křížení 3 25%

Zpětné křížení 4 25%

Zpětné křížení 10 25%

5/24 ~ 21%

6/24 ~ 25%

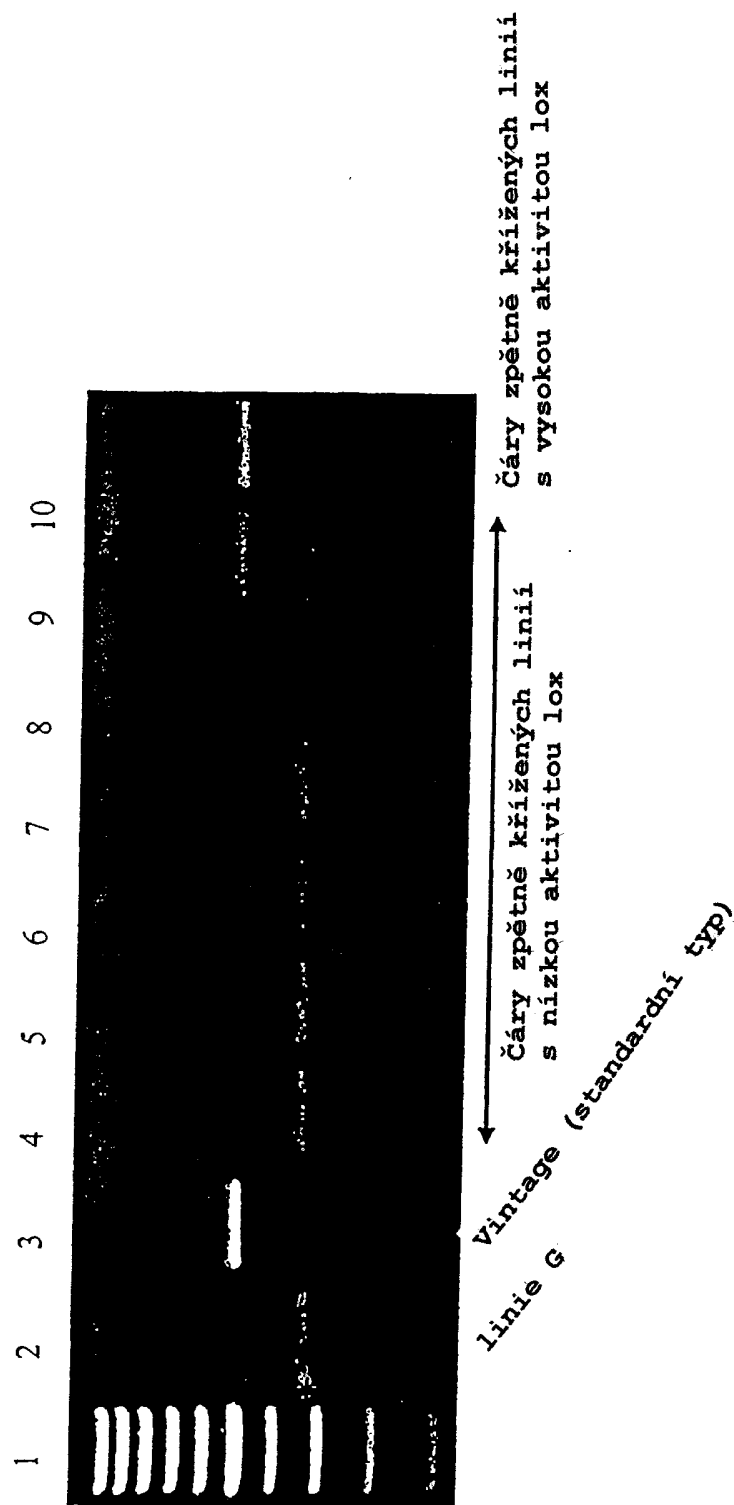
6/24 ~ 25%

5/24 ~ 21%

10000

Obr. 21

500 bp –
(bp = párů bází)



12.09.03

Obr. 22A

Seřazení sekvencí aminokyseliny lipoxygenázy

	1	E1			H							
Gm1	MFS.....	A.GHKIKGTVVLMRKNELE.....				VNPDGSAV						
Gm2	MFSVPGVSGILNRGG.GHKIKGTVVLMRKNVLDNFNSVADLTGKNVGGGLIGTGLNVVGSTL											
Gm3	M.....	LGGLLHRG...HKIKGTVVLMRKNVLDVNSVT....				SVGGIIGQGLDLVGSTL						
Hv2	MLGVGGIVSDLTGGIRGAHLKGSVVMRKNAIDFN.....					DFGAHVM						
Hv1	ML.LGGLIDTLTGANKSARLKGTVVLMRKNVLDLN.....					DFGATII						
	61	+	E2	++	+	E3	+	+	E4	120		
Gm1	DNLNAFLGRSVSLQLISATKADAH..		GKGKVGKDTFLEG..			INTSLPTLGAGESAFNIHF						
Gm2	DNLTAFLGRSVALQLISATKPLAN..		GKGKVGKDTFLEG..			IIVSLPTLGAGESAFNIQ						
Gm3	DTLTAFLGRSVSLQLISATKADAN..		GKGKLGKATFLEG..			IITSLPTLGAGQSAFKINF						
Hv2	DGVTELLGRGVTCQLISSTNVHDHNGGRGKVGAEANLEQWLLPTNLPFITTKENKFAVTF											
Hv1	DGIGIEFLGKGVTCQLISSTAVDQDNGGRGKVGAEAELEQWV..		TSLPSLTGSGKFGTLF									
	121	+	+	E5		E6	+		E7	E8	180	
Gm1	EWD.GSMGIPGAFYIKNYMQVEFFLKSITLEAISNQ..					GTIRFVCNSWVYNTKLYKSVRIF						
Gm2	EWD.ESMGIPGAFYIKNYMQVEFFLKSITLEDVNPQ..					GTIRFVCNSWVYNTKLYKSVRIF						
Gm3	EWD.DSGIPGAFYIKNFMQTEFFLVSLTLEDIPNH..					GSIHVCNSWIYNALFKSDRIF						
Hv2	DWSVDKLGVPGAIVKNNHASEFFLKTITLDNVPGR..					GTIVFVANSWVYPQAKYRYNRVF						
Hv1	DWEVEKLGVPGAIVVNHYHSSEFLKTTILHDVPGRSGNLTFVANSWIYPANRYRSRVF											
	181	+	+	H1		+	+		E	+	240	
Gm1	FANHTYVPSETPAPLVSYREEELKSLRGNGT..					GERKEYDRIYDYDVYNDLGNPDKSEKLA						
Gm2	FANHTYVPSETPAPLVGYREEELKSLRGDGGK..					GERKEHDRIYDYDVYNDLGNPDHGENFA						
Gm3	FANQTYLPSETPAPLVKYREEELHNLRGDGT..					GERKEWERIYDYDVYNDLGDPDKGENHA						
Hv2	FANDTYLPHQMPAALKPYRDEELRNLRGDDQGGPYLDHDRVYRYDVYNDLGD.....					S						
Hv1	FANDTYLPSQMPAALKPYRDEELRNLRGDDQGGPYQEHRIYRYDVYNDLGE.....					G						
	241	++	+		+				•••	•	300	
Gm1	RPVLGGSSTFPYPRRGRTGRGPTVTDPNTEKQ....					GEVFFVPRDENLGHLSKDALEIG						
Gm2	RPILGGSSTHFPYPRRGRTGRYPTRKDQNSEKP....					GEV.YVPRDENFGHLKSSDFLAYG						
Gm3	RPVLGGNDTFPYPRRGRTGRKPTRKDPNSESR....					SNDVYLPRDEAFGHLKSSDFLTYG						
Hv2	RDVLGGSKDLPYPRRCRTGRKPSDSKPDHESRLLLLLVQNVYVLRDELFGHLKQSDLLGYT											
Hv1	RPILGGNSDHPYPRRGRTGRKPNASDPSLESRLSLL..					EQIYVPRDEKFGHLKTSDFLGYS						
	•		H2		+		H3	++	+	H4	+	360
Gm1	TKSLSQIVQPAFESAFDLKSTPIEFHSFQDVHDLYEGGKILPR....					DVISTIIPLPVIK						
Gm2	IKSLSQYVLPAPFESVFDLNFPTNEFDSFQDVRDLHEGGIKLPT....					EVISTIMPLPVVK						
Gm3	LKSVSQNVLPQLQSAFDLNFPTREFDSFDEVHGLYSGGKILPT....					DIISKISPLPVLK						
Hv2	LKGWLDGIIAIRTYVDL..		SPGEFDSFADILKLYEGGKILPNIPALEEVRKRFPQLQVK									
Hv1	IKAITQGILPAVRTYVDT..		TPGEFDSFQDIINLYEGGKILPKVAALEELRKQFPLQLIK									
	E10	+	E11	+	+		H6	+		E12	++	420
Gm1	ELYRTDGQHILKFPQPHVVQVSQSAWMTDEEFAREMIAGVNPOVIRGLEEFPPKSNLDP											
Gm2	ELFRTDGEQVLKFPPPHVIQVSKSAWMTDEEFAREMVAGVNPOVIRGLQEFPPKSNLDPT											
Gm3	EIFRTDGEQALKFPKPKVIQVSKSAWMTDEEFAREMLAGVNPNIIRCLKDFPPKSKLDSQ											
Hv2	DLIPKGGDFLLKLPKPEIIKVDQKAWMTDEEFAREMLAGVNPMMIKRLTEFPPKSTLDPS											
Hv1	DLLPVGGDSLLKLPVPHIIQENKQAWMTDEEFAREVLAVNPVMITRLTEFPPKSSLDPS											
	+		+				H7		E13		H8	480
Gm1	IYGDQSSKITADSLD..		LDGYTMDEALGSRRLFMDYHDI			FMPYVRQINQLNSAKTYATR						
Gm2	IYGEQTSKITADALD..		LDGYTVDEALASRRLFMDYHDF			FMPYIRRINQ.TYAKAYATR						
Gm3	VYGDHTSQITKEHLEPNLEGLTVDEAIQNKRLFLD		HHDPIMPYLRINA.TSTKAYATR									
Hv2	KYGDHTSTMTEEHVAKSLEGLTVQQAALAGNRLYIVDQHDNLMPFLIDINNLDASFVYATR											
Hv1	KFGDHTSTITAEHIEKNLEGLTVQQALESNRLYI		HHDRFMPFLIDVNNLPGNFIYATR									

Obr. 22B

	E14	+	E15	+	E16	+	+	H9	540			
Gm1	TILFLREDGTLKPVAIELSLPHSAGDLSAAVSQVVLPAKEG.VESTIWL							AKAYVIVNDS				
Gm2	TILFLRENGTLKPVAIELSLPHSAGDLSGAVSQVILPAKEG.VESTIWL							AKAYVVVNDG				
Gm3	TILFLKNDGTLRPLAIELSLPHSAGDLSGAVSQVFLPADEG.VESSIWL							AKAYVVVNDG				
Hv2	TLLFLRGDGTLPVAIELSSPLIQGELTTAKSAVYTPQHAG.VEGWIWQL							AKAYASVNDY				
Hv1	TLFFLRGDGRLTPLAIELSEPIIQGLTTAKSKVYTPVPSGSVEGWVWEL							AKAYVAVNDS				
	541	•	•	•	H9		+H10	+	•	H11	600+	
Gm1	CYHQLMSHWLNTHAAMEPFVIATHRHLSVLHPHYKLLTPHYRNNMNN									INALARQSLINANG		
Gm2	CYHQLMSHWLNTHAVIEPFIIATNRHLSALHPHYKLLTPHYRDTMNN									INALARQSLINADG		
Gm3	CYHQLVSHWLNTHAVVEPFIIATNRHLSVHHPHYKLLTPHYRDTMNN									INGLARLSLVNDGG		
Hv2	GWHQLISHWLNTHAVMEPFVIATNRQLSVTHPVYKLLHPHYRDTMNN									INARARGLLINAGG		
Hv1	GWHQLVSHWLNTHAVMEPFVISTNRHLSVTHPVHKLSPHYRDTMTIN									ALARQTLINAGG		
	601	H12		H13		+H14	+	E	+	E	+660	
Gm1	IIETTELPSKYSVEMSSAVYKNWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSTPH									GVRLIEDYPYA		
Gm2	IIEKSELPSKHSVEMSSAVYKNWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPSAPH									GLRLIEDYPYA		
Gm3	VIETTELWGRYSVEMSSAVYKDWVFTDQALPADLIKRGMAIEDPSCPH									GIRLVIEDYPYT		
Hv2	VIEMTVFPHKHAMPSSSMVYKHWNFTEQALPADLIKRGMAVEDASSP									HKVRLLIKDYPYA		
Hv1	IIEMTVFPGKFALGMSAVYKDWKFTEQGLPDDLIKRGMAVEDPSSPY									KVRLLVSDYPYA		
	661	H15		H16		H17	+	+			+720	
Gm1	ADGLEIWAIAIKTWQYEVPLYARDDDVKNDSELQHWKKEAVEKGHGD									LKDKPWWPKLQT		
Gm2	VDGLEIWAIAIKTWQYEVSLYARDDDVKPDSELQQWKEAVEKGHGD									LKDKPWWPKLQT		
Gm3	VDGLEIWDIAIKTWVHEYVFLYYKSDDTLREDPELQACWKEVEVGH									GDKKNEPWWPKMQT		
Hv2	TDGLAVWDAIEQWVSDYLTIIYPNDGVLOQDVELQAWWKEVREVG									HDLDKDAWWPKMQT		
Hv1	ADGLAIWHAIEQYVSEYLAIIYPNDGVLOQDTEVQAWWKETREVG									HDLDKAPWWPKMQS		
	721		H18	•	•	•	+	•	+	+	H19	780
Gm1	LEDLVEVCLIIIIWIASALHAAVNFGQYFYGGIILNRPTASRRLLPE										KGTPEYEEMINNHE	
Gm2	IEELVEICTIIIIWTASALHAAVNFGQYFYGGIILNRPTSSRRLLPE										KGTPEYEEMVKS HQ	
Gm3	REELVEACIIIIWTASALHAAVNFGQYFYGGIILNRPTLSRRFMPE										KGS AEYEELRKNPQ	
Hv2	VAELIKACATIIITGSALHAAVNFGQYFYSGYHFNKESASRRMPVQ										GSEYAELE RDPE	
Hv1	VPELAKACTTIIWIGSALHAAVNFGQYFYAGFLNRPVTSRRMPPE										PGTEEYAELE RDPE	
	781	H20		H21	•	•	•	+	+		H22	840
Gm1	KAYLRTITSKLPTLISLSVIEIILSTHASDEVYLCQRDNPHWTS DSK										ALQAFQKFGNKLKE	
Gm2	KAYLRTITSKFQTLVDLSVIEIILSRHASDEVYLCQRDNPHWTS DSK										ALQAFQKFGNKLKE	
Gm3	KAYLKTITPKFQTLIDLSVIEIILSRHASDEVYLCQRDNPNWTS DTR										ALEAFKRFGNKLAQ	
Hv2	KAFIRTITTSQFHALVGISLMEIILSKHSSDEVYLCQHDTPAWTS DAK										ALEAFKRFGAKLEG	
Hv1	RAFIHTITTSQIQTIIGVSLLEVIILSKHSSDELYLCQRDTPEWTS DPK										ALEVFRFS DRLVE	
	841		++	+	+	+		+	+	+	895*	
Gm1	IEEKLVRNNDPSLQGNRLGPVQLPYTLLPSSEE.....GLTFRGIPNSISIT											
Gm2	IEEKLARKNNDQSL.SNRLGPVQLPYTLLHPNSE.....GLTCRGIPNSISIT											
Gm3	IENKLSERNNDEKLR.NRCGPVQMPYITLLPSSKE.....GLTFRGIPNSISIT											
Hv2	IEKQVVMNSDPQLK.NRTGPAKFYMLLYPNTSDHTGQAEGLTARGIPNSISIT											
Hv1	IESKVVMNHDPELK.NRNGPAKFYMLLYPNTSDHKGAAGLTAKGIPNSISIT											

Gm1 sekvence identifikační číslo: 15 "Systém číslování zobrazený výše
 Gm2 sekvence identifikační číslo: 16 toto seřazení sekvence neodpovídá
 Gm3 sekvence identifikační číslo: 17 skutečnému číslu aminokyselin
 Hv2 sekvence identifikační číslo: 18 z jakékoliv sekvence lipoxygenázy
 Hv1 sekvence identifikační číslo: 9 v tomto seřazení.

1/27

Seznam sekvenci

<110> Douma, Anneke
Doderer, Albert
Cameron-Mills, Verena
Skadhauge, Birgitte
Bech, Lene

<120> LOW LIPOXYGENASE 1 BARLEY

<130> 11225.12W001

<160> 18

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1
<211> 143
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 1
ctaagccatc ggcaaccatg gatgaataaa gggcgttcgc cacgtacgaa acttgtcgag 60
agattggtgt agtggtgtgc tgtgacagta ctatgtcagc agttgctctt taagccgaat 120
aaataaagca gatttgcttc caa 143

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Hordeum vulgare

<400> 2
gaaaagcttg gaggtagacg ctgc 24

2/27

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 3

tataggatcc ttgttcttgg cctcctctcc tcg

33

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 4

agtgaaaaac agtgtgctgg tg

22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 5

ggcttaaaga gcaactgctg a

21

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 6

caagatgcat atgctgctgg gag

23

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 7
cgatggttta aattagatgg agatgctgt

29

<210> 8

<211> 4663

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 8
cagcccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60
atgggcgatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgcg aagcacgagg agggcacgtc 120
accgtccgcg cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180
gcgccacacc accgggaccg gaccgggacc ggccataaaa ttgcccggac cgagctgcaa 240
gcagctcctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300
tgtgctggtg ccattggttg gagcagtgaag agcgaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360
tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccgg ctcaagggca 420
cgggtggtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480
acggcatcgg cgagttcctc ggcaagggcg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccc 540
tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ccttctcctc tgtttacaag atatagtatt 600
tctttcgtgt gggccggcgg ccattggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660
aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcatatgcc atcgaaaaaa 720
gagacaacag catgcatgca tgggtgcgcg accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780
gacaaagcaa cacaacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840
cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaagaa cgtaagagca agcacacaat 900
cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960
gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020
aggggtacgtg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtagc 1080
tggtggtgca gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggcgcg gaggcggagc tggagcagtg 1140
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ctttcgactg 1200
ggaggtggag aagctcgggg tgccgggcgc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga 1260
gttcctgctt aaaaccatca cctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt 1320
cgtcgccaac tcatggatct accccgcccgc caactaccga tacagccgcg tcttcttcgc 1380
caacgacgtg cgtggatttt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca 1440

4/27

ttcattggtcg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca 1500
 ctttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga 1560
 tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat 1620
 aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt 1680
 ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaaacgatt aaattaagca 1740
 taaaaagaaa aggaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt 1800
 agatatgcaa tttttatctt acatctaaac ctttcttcat tcttaaatat aagacatttg 1860
 taagatttca ctatggacaa catacgaaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt 1920
 atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca 1980
 taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga 2040
 tgccggcggc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgcgt ggcgacgacc 2100
 agcagggccc gtaccaggag cacgaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg 2160
 gcgagggccc ccccatcctc ggcggaact ccgaccaccc ttaccgcgc cgcgccgca 2220
 cggagcgcaa gcccaacgcc agcgacccga gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc 2280
 agatctacgt gccgcgggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct 2340
 actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca 2400
 cccccggcga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcataagc 2460
 tgcccaaggt ggccgccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg 2520
 acctcctccc cgtcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg 2580
 agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgacg ggagggtgct gccggcgta 2640
 acccggtcat gatcacgcgt ctacgggtga gtcagcgatt atttgttcat tgttgtgtga 2700
 tgggtgtccat ggtgagaaag tgcagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct 2760
 gcatgcatgc aggagtcccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac 2820
 accagcacca tcacggcgga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag 2880
 gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta 2940
 gataatttgg cttcgttgca attaatgtga tgctggccga tcaagtgatc gtattgggtt 3000
 tgaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc 3060
 atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccgggaact tcatctacgc cacgaggacc 3120
 ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc 3180
 atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaaggttt acacgccggt gccagcggc 3240
 tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtaaa tgactccggg 3300
 tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacgtt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga 3360

5/27

tgcacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat tgaaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420
 gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cggtgcacaa 3480
 gctgctgagc ccgcactacc gcgacacccat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540
 catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccc ggcaagtctc cgttggggat 3600
 gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660
 caagaggtag gtacctggtg aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca 3720
 ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggaccc gtcgagcccc 3780
 tacaaggtag ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgc cggacgggct ggcgatctgg 3840
 cagccattg agcagtacgt gagcgagtac ctggccatct actaccgaa cgacggcggtg 3900
 ctgcagggcg atacggaggt gcaggcgtgg tggaaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960
 gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020
 tgcaccacca tcactctgat cgggtcggcg ctgcatgcgc cagtcaactt cgggcagtac 4080
 ccctacgcgc ggttcctccc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgcat gccggagccc 4140
 ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccggagc gggccttcat ccacaccatc 4200
 acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260
 tccgacgagc tgtacctcgc gcagcgggac acgccggagt ggacctcgga cccaaaggcc 4320
 ctggagggtg tcaagcggtt cagcgaccgg ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc 4380
 atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggcccgc ctaagtttcc ctacatgctg 4440
 ctctacccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc 4500
 cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560
 gccacgtacg aaacttgctg agagattggt gtagtggtg tctgtgacag tactatgtca 4620
 gcagttgctc ttttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc 4663

<210> 9

<211> 862

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 9

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp
 20 25 30

12.09.03

Leu Asn Asp Phe Gly Ala Thr Ile Ile Asp Gly Ile Gly Glu Phe Leu
 35 40 45
 Gly Lys Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Ala Val Asp Gln
 50 55 60
 Asp Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Trp Val Thr Ser Leu Pro Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ser Lys Phe Gly
 85 90 95
 Leu Thr Phe Asp Trp Glu Val Glu Lys Leu Gly Val Pro Gly Ala Ile
 100 105 110
 Val Val Asn Asn Tyr His Ser Ser Glu Phe Leu Leu Lys Thr Ile Thr
 115 120 125
 Leu His Asp Val Pro Gly Arg Ser Gly Asn Leu Thr Phe Val Ala Asn
 130 135 140
 Ser Trp Ile Tyr Pro Ala Ala Asn Tyr Arg Tyr Ser Arg Val Phe Phe
 145 150 155 160
 Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro Ser Gln Met Pro Ala Ala Leu Lys Pro
 165 170 175
 Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln Gln Gly
 180 185 190
 Pro Tyr Gln Glu His Asp Arg Ile Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr Asn Asp
 195 200 205
 Leu Gly Glu Gly Arg Pro Ile Leu Gly Gly Asn Ser Asp His Pro Tyr
 210 215 220
 Pro Arg Arg Gly Arg Thr Glu Arg Lys Pro Asn Ala Ser Asp Pro Ser
 225 230 235 240
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Val Pro Arg Asp
 245 250 255
 Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile
 260 265 270
 Lys Ala Ile Thr Gln Gly Ile Leu Pro Ala Val Arg Thr Tyr Val Asp
 275 280 285
 Thr Thr Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Ile Ile Asn Leu Tyr
 290 295 300
 Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Lys Val Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg
 305 310 315 320
 Lys Gln Phe Pro Leu Gln Leu Ile Lys Asp Leu Leu Pro Val Gly Gly
 325 330 335
 Asp Ser Leu Leu Lys Leu Pro Val Pro His Ile Ile Gln Glu Asn Lys
 340 345 350
 Gln Ala Trp Arg Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Val Leu Ala Gly
 355 360 365
 Val Asn Pro Val Met Ile Thr Arg Leu Thr Glu Phe Pro Pro Lys Ser

12.09.03

370 375 7/27 380
 Ser Leu Asp Pro Ser Lys Phe Gly Asp His Thr Ser Thr Ile Thr Ala
 385 390 395 400
 Glu His Ile Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln Gln Ala Leu
 405 410 415
 Glu Ser Asn Arg Leu Tyr Ile Leu Asp His His Asp Arg Phe Met Pro
 420 425 430
 Phe Leu Ile Asp Val Asn Asn Leu Pro Gly Asn Phe Ile Tyr Ala Thr
 435 440 445
 Arg Thr Leu Phe Phe Leu Arg Gly Asp Gly Arg Leu Thr Pro Leu Ala
 450 455 460
 Ile Glu Leu Ser Glu Pro Ile Ile Gln Gly Gly Leu Thr Thr Ala Lys
 465 470 475 480
 Ser Lys Val Tyr Thr Pro Val Pro Ser Gly Ser Val Glu Gly Trp Val
 485 490 495
 Trp Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ala Val Asn Asp Ser Gly Trp His
 500 505 510
 Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu Pro Phe
 515 520 525
 Val Ile Ser Thr Asn Arg His Leu Ser Val Thr His Pro Val His Lys
 530 535 540
 Leu Leu Ser Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Thr Ile Asn Ala Leu Ala
 545 550 555 560
 Arg Gln Thr Leu Ile Asn Ala Gly Gly Ile Phe Glu Met Thr Val Phe
 565 570 575
 Pro Gly Lys Phe Ala Leu Gly Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp Trp
 580 585 590
 Lys Phe Thr Glu Gln Gly Leu Pro Asp Asp Leu Ile Lys Arg Gly Met
 595 600 605
 Ala Val Glu Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser
 610 615 620
 Asp Tyr Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu
 625 630 635 640
 Gln Tyr Val Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val
 645 650 655
 Leu Gln Gly Asp Thr Glu Val Gln Ala Trp Trp Lys Glu Thr Arg Glu
 660 665 670
 Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Pro Trp Trp Pro Lys Met Gln
 675 680 685
 Ser Val Pro Glu Leu Ala Lys Ala Cys Thr Thr Ile Ile Trp Ile Gly
 690 695 700
 Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly
 705 710 715 720

agtgtgtctgg	tgccattggt	tggagcagtg	aaagcgagga	gaggaggcca	60
agaacaagat	gctgtctggga	gggctgatcg	acaccctcac	gggggccaac	120
ggctcaaggg	cacggtggtg	ctcatgcgca	agaacgtgct	ggacctcaac	180
ccaccatcat	cgacggcatc	ggcgagttcc	tgggcaaggg	cgtcacctgc	240
gtccaccgc	cgtcgaccaa	gacaacggcg	gtcgcgggaa	ggtgggcgcg	300
tggagcagtg	ggtgacgagc	ctgccgtcgc	tgacgacggg	ggagtccaag	360
ccttcgactg	ggagggtggag	aagctcgggg	tgccggggcg	catcgtcgtc	420
acagctccga	gttcctgctt	aaaaccatca	ccctccacga	cgccccggc	480
acctcacctt	cgtcgccaac	tcatggatct	accccgccgc	caactaccga	540
tcttcttcgc	caacgacacg	tacctgccga	gccagatgcc	ggcggcgctg	600
gcgacgacga	gctccggaac	ctgcgtggcg	acgaccagca	ggggccgtac	660
accgcatcta	ccgctacgac	gtctacaacg	acctcggcgga	gggccgcccc	720
gcaactccga	ccacccttac	ccgcgcgcgc	gccgcacgga	gcgcaagccc	780

12.09.03

9/27

acccgagcct ggagagccgg ctgtcgctgc tggagcagat ctacgtgccg cgggacgaga	840
agttcggcca cctcaagacg tccgacttcc tgggctactc catcaaggcc atcacgcagg	900
gcatcctgcc ggccgtgcgc acctacgtgg acaccacccc cggcgagtgc gactccttcc	960
aggacatcat caacctctat gagggcggca tcaagctgcc caaggtggcc gccctggagg	1020
agctccgtaa gcagttcccc ctccagctca tcaaggacct cctccccgtc ggcgggcagct	1080
ccctgcttaa gctccccgtg ccccacatca tccaggagaa caagcaggcg tggaggaccg	1140
acgaggagtt cgcacgggag gtgctcgccg gcgtcaaccc ggcatgatc acgcgtctca	1200
cggagttccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtagacc accagcacca	1260
tcacggcgga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag gcgctggaaa	1320
gcaacaggct gtacatcctt gatcaccatg accggttcat gccgttcttg atcgacgtca	1380
acaacctgcc cggcaacttc atctacgcca cgaggacct cttcttcttg cgcggcgacg	1440
gcaggctcac gccgtcgcc atcgagctga gcgagcccat catccagggc ggccttacca	1500
cggccaagag caaggtttac acgccggtgc ccagcggctc cgtcgaaggc tgggtgtggg	1560
agctcgccaa ggcctacgtc gccgtcaatg actccgggtg gcaccagctc gtcagccact	1620
ggctgaacac tcacgcggtg atggagccgt tcgtgatctc gacgaaccgg caccttagcg	1680
tgacgcaccc ggtgcacaag ctgctgagcc cgcactaccg cgacaccatg accatcaacg	1740
cgctggcgcg gcagacgctc atcaacgccg gcggcatctt cgagatgacg gtgttccccg	1800
gcaagttcgc gttggggatg tcggccgtgg tgtacaagga ctggaagttc accgagcagg	1860
gactgccgga cgatctcatc aagaggggca tggcgggtgga ggaccgcgtc agcccgatca	1920
aggtgcggtt gctggtgtcg gactaccctg acgcggcgga cgggctggcg atctggcacg	1980
ccattgagca gtacgtgagc gagtacctgg ccatctacta cccgaacgac ggcgtgctgc	2040
agggcgatac ggaggtgcag gcgtgggtgga aggagacgcg cgaggtcggg cacggcgacc	2100
tcaaggacgc cccatggtgg cccaagatgc aaagtgtgcc ggagctggcc aaggcgtgca	2160
ccaccatcat ctggatcggg tcggcgctgc atgcggcagt caacttcggg cagtaccctt	2220
acgcgggggt cctcccgaac cggccgacgg tgagccggcg ccgcatgccg gagcccgga	2280
cggaggagta cgcggagctg gagcgcgacc cggagcgggc cttcatccac accatcacga	2340
gccagatcca gaccatcatc ggcgtgtcgc tgctggaggt gctgtcgaag cactcctccg	2400
acgagctgta cctcgggcag cgggacacgc cggagtggac ctcggaccca aaggccctgg	2460
aggtgttcaa gcggttcagc gaccggctgg tggagatcga gagcaagggtg gtgggcatga	2520
accatgaccc ggagctcaag aaccgcaacg gcccggctaa gtttccctac atgctgtctt	2580
acccaacac ctccgaccac aagggcgccg ctgccgggct taccgccaag ggcattccca	2640
acagcatctc catctaattt aagccatcgg caaccatgga tgaataaagg gcgttcgcca	2700

12.09.03

10/27

cgtacgaaac ttgtcgagag attggtgtag tgtgtgtctg tgacagtact atgtcagcag 2760
 ttgctcttta agccgaataa ataaagcaga ttgtcttcca aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2818

<210> 11

<211> 4663

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> variace

<222> (2346)..(2348)

<223> „n“ je a, c, t, nebo g je kódující kyselá, bazická nebo
 polární aminokyselina

<400> 11

cagcccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60
 atgggcatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgcg aagcacgagg agggcacgtc 120
 accgtccgcg cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180
 gcgccacacc accgggaccg gacccggacc ggcctataaa ttgcccgga cagactgcaa 240
 gcagctcctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300
 tgtgtggtg ccattggtg gagcagtga agcgaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360
 tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccgg ctcaagggca 420
 cgggtgtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480
 acggcatcgg cgagttcctc ggcaagggtg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccg 540
 tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg cttctcctc tgtttacaag atatagtatt 600
 tctttcgtgt gggccggcgg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660
 aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcatatgcc atcgaaaaaa 720
 gagacaacag catgcatgca tgggtgcgcg accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780
 gacaaagcaa cacaacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840
 cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaaaga cgtaagagca agcacacaat 900
 cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960
 gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020
 agggtagctg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtacg 1080

12.09.03

11/27

tggtggtgca gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggcgcg gaggcggagc tggagcagtg	1140
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg	1200
ggaggtggag aagctcgggg tgccgggcgc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga	1260
gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt	1320
cgtcgccaac tcatggatct accccgccgc caactaccga tacagccgcg tcttcttcgc	1380
caacgacgtg cgtggatttt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca	1440
ttcatggctg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca	1500
cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga	1560
tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat	1620
aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt	1680
ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaaacgatt aaattaagca	1740
taaaaagaaa aggaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt	1800
agatatgcaa tattttatctt acatctaaac ctttcttcat tcttaaatat aagacatttg	1860
taagatttca ctatggacaa catacgaaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt	1920
atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca	1980
taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga	2040
tgccggcggc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgcgt ggcgacgacc	2100
agcagggccc gtaccaggag cacgaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg	2160
gcgagggccg ccccatcctc ggcgggcaact ccgaccaccc ttacccgcgc cgcggccgca	2220
cggagcgcaa gccaacgcc agcgaccgca gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc	2280
agatctacgt gccgcgggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcctgggct	2340
actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca	2400
ccccggcgga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcataaagc	2460
tgcccaaggt ggccgccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg	2520
acctcctccc cgtcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg	2580
agaacaagca ggctggagg accgacgagg agttcgcacg ggagggtgct gccnnngtca	2640
acccggtcat gatcacgcgt ctacgggtga gtcagcgatt atttgttcat tgtgtgtgta	2700
tggtgtccat ggtgagaaaag tgcagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct	2760
gcatgcatgc aggagttccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtgaccac	2820
accagcacca tcacggcgga gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag	2880
gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta	2940
gataatttgg cttcgttgca attaatattga tgctggccga tcaagtgatc gtattggggt	3000

12/27

tgaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc	3060
atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc cacgaggacc	3120
ctctttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc	3180
atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaagggtt acacgccggt gcccagcggc	3240
tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg	3300
tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacgtt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga	3360
tgcacaacaa ctgatcgaat tatgattgat tgaaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt	3420
gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cgggtgcacaa	3480
gctgctgagc ccgcactacc gcgacaccat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct	3540
catcaacgcc ggccgcatct tcgagatgac ggtgttcccc ggcaagttcg cgttggggat	3600
gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat	3660
caagaggtac gtacctggtt aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca	3720
ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcatggcgg tggaggacct gtcgagcccc	3780
tacaagggtg ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg	3840
cacgccattg agcagtagct gagcgagtac ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg	3900
ctgcagggcg atacggaggt gcaggcgtgg tgggaaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc	3960
gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg	4020
tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtag	4080
ccctacgcgg ggttcctccc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgcat gccggagccc	4140
ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccggagc gggccttcat ccacaccatc	4200
acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc	4260
tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgccggagt ggacctcgga cccaaaggcc	4320
ctggaggtgt tcaagcggtt cagcgaccgg ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc	4380
atgaaccatg acccgagct caagaaccgc aacggccccg ctaagtttcc ctacatgctg	4440
ctctacccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc	4500
cccaacagca tctccatcta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc	4560
gccacgtacg aaacttgctg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca	4620
gcagttgctc ttttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc	4663

<210> 12

<211> 862

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> variace

<222> (368)..(368)

<223> „Xaa“ je kyselá, bazická nebo polární aminokyselina

<400> 12

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp
 20 25 30
 Leu Asn Asp Phe Gly Ala Thr Ile Ile Asp Gly Ile Gly Glu Phe Leu
 35 40 45
 Gly Lys Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Ala Val Asp Gln
 50 55 60
 Asp Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Glu Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Trp Val Thr Ser Leu Pro Ser Leu Thr Thr Gly Glu Ser Lys Phe Gly
 85 90 95
 Leu Thr Phe Asp Trp Glu Val Glu Lys Leu Gly Val Pro Gly Ala Ile
 100 105 110
 Val Val Asn Asn Tyr His Ser Ser Glu Phe Leu Leu Lys Thr Ile Thr
 115 120 125
 Leu His Asp Val Pro Gly Arg Ser Gly Asn Leu Thr Phe Val Ala Asn
 130 135 140
 Ser Trp Ile Tyr Pro Ala Ala Asn Tyr Arg Tyr Ser Arg Val Phe Phe
 145 150 155 160
 Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro Ser Gln Met Pro Ala Ala Leu Lys Pro
 165 170 175
 Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln Gln Gly
 180 185 190
 Pro Tyr Gln Glu His Asp Arg Ile Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr Asn Asp
 195 200 205
 Leu Gly Glu Gly Arg Pro Ile Leu Gly Gly Asn Ser Asp His Pro Tyr
 210 215 220
 Pro Arg Arg Gly Arg Thr Glu Arg Lys Pro Asn Ala Ser Asp Pro Ser
 225 230 235 240
 Leu Glu Ser Arg Leu Ser Leu Leu Glu Gln Ile Tyr Val Pro Arg Asp
 245 250 255
 Glu Lys Phe Gly His Leu Lys Thr Ser Asp Phe Leu Gly Tyr Ser Ile

12.09.03

14/27

260	265	270
Lys Ala Ile Thr Gln Gly Ile Leu Pro Ala Val Arg Thr Tyr Val Asp		
275	280	285
Thr Thr Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Ile Ile Asn Leu Tyr		
290	295	300
Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Lys Val Ala Ala Leu Glu Glu Leu Arg		
305	310	315
Lys Gln Phe Pro Leu Gln Leu Ile Lys Asp Leu Leu Pro Val Gly Gly		
325	330	335
Asp Ser Leu Leu Lys Leu Pro Val Pro His Ile Ile Gln Glu Asn Lys		
340	345	350
Gln Ala Trp Arg Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Val Leu Ala Xaa		
355	360	365
Val Asn Pro Val Met Ile Thr Arg Leu Thr Glu Phe Pro Pro Lys Ser		
370	375	380
Ser Leu Asp Pro Ser Lys Phe Gly Asp His Thr Ser Thr Ile Thr Ala		
385	390	395
Glu His Ile Glu Lys Asn Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln Gln Ala Leu		
405	410	415
Glu Ser Asn Arg Leu Tyr Ile Leu Asp His His Asp Arg Phe Met Pro		
420	425	430
Phe Leu Ile Asp Val Asn Asn Leu Pro Gly Asn Phe Ile Tyr Ala Thr		
435	440	445
Arg Thr Leu Phe Phe Leu Arg Gly Asp Gly Arg Leu Thr Pro Leu Ala		
450	455	460
Ile Glu Leu Ser Glu Pro Ile Ile Gln Gly Gly Leu Thr Thr Ala Lys		
465	470	475
Ser Lys Val Tyr Thr Pro Val Pro Ser Gly Ser Val Glu Gly Trp Val		
485	490	495
Trp Glu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ala Val Asn Asp Ser Gly Trp His		
500	505	510
Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu Pro Phe		
515	520	525
Val Ile Ser Thr Asn Arg His Leu Ser Val Thr His Pro Val His Lys		
530	535	540
Leu Leu Ser Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Thr Ile Asn Ala Leu Ala		
545	550	555
Arg Gln Thr Leu Ile Asn Ala Gly Gly Ile Phe Glu Met Thr Val Phe		
565	570	575
Pro Gly Lys Phe Ala Leu Gly Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp Trp		
580	585	590
Lys Phe Thr Glu Gln Gly Leu Pro Asp Asp Leu Ile Lys Arg Gly Met		
595	600	605

15/27

Ala Val Glu Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser
610 615 620
Asp Tyr Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu
625 630 635 640
Gln Tyr Val Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val
645 650 655
Leu Gln Gly Asp Thr Glu Val Gln Ala Trp Trp Lys Glu Thr Arg Glu
660 665 670
Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Pro Trp Trp Pro Lys Met Gln
675 680 685
Ser Val Pro Glu Leu Ala Lys Ala Cys Thr Thr Ile Ile Trp Ile Gly
690 695 700
Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly
705 710 715 720
Phe Leu Pro Asn Arg Pro Thr Val Ser Arg Arg Arg Met Pro Glu Pro
725 730 735
Gly Thr Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Arg Ala Phe
740 745 750
Ile His Thr Ile Thr Ser Gln Ile Gln Thr Ile Ile Gly Val Ser Leu
755 760 765
Leu Glu Val Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Leu Tyr Leu Gly Gln
770 775 780
Arg Asp Thr Pro Glu Trp Thr Ser Asp Pro Lys Ala Leu Glu Val Phe
785 790 795 800
Lys Arg Phe Ser Asp Arg Leu Val Glu Ile Glu Ser Lys Val Val Gly
805 810 815
Met Asn His Asp Pro Glu Leu Lys Asn Arg Asn Gly Pro Ala Lys Phe
820 825 830
Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Lys Gly Ala Ala
835 840 845
Ala Gly Leu Thr Ala Lys Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
850 855 860

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<400> 13
cgctacgacg tctacaacga

20

<210> 14

16/27

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Hordeum vulgare

<400> 14
 cagactactt tttggcggga

20

<210> 15
 <211> 839
 <212> PRT
 <213> Glycine max

<400> 15

Met Phe Ser Ala Gly His Lys Ile Lys Gly Thr Val Val Leu Met Pro
 1 5 10 15
 Lys Asn Glu Leu Glu Val Asn Pro Asp Gly Ser Ala Val Asp Asn Leu
 20 25 30
 Asn Ala Phe Leu Gly Arg Ser Val Ser Leu Gln Leu Ile Ser Ala Thr
 35 40 45
 Lys Ala Asp Ala His Gly Lys Gly Lys Val Gly Lys Asp Thr Phe Leu
 50 55 60
 Glu Gly Ile Asn Thr Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Glu Ser Ala
 65 70 75 80
 Phe Asn Ile His Phe Glu Trp Asp Gly Ser Met Gly Ile Pro Gly Ala
 85 90 95
 Phe Tyr Ile Lys Asn Tyr Met Gln Val Glu Phe Phe Leu Lys Ser Leu
 100 105 110
 Thr Leu Glu Ala Ile Ser Asn Gln Gly Thr Ile Arg Phe Val Cys Asn
 115 120 125
 Ser Trp Val Tyr Asn Thr Lys Leu Tyr Lys Ser Val Arg Ile Phe Phe
 130 135 140
 Ala Asn His Thr Tyr Val Pro Ser Glu Thr Pro Ala Pro Leu Val Ser
 145 150 155 160
 Tyr Arg Glu Glu Glu Leu Lys Ser Leu Arg Gly Asn Gly Thr Gly Glu
 165 170 175
 Arg Lys Glu Tyr Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn Asp Leu
 180 185 190
 Gly Asn Pro Asp Lys Ser Glu Lys Leu Ala Arg Pro Val Leu Gly Gly
 195 200 205

12.09.03

17/27

Ser Ser Thr Phe Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Gly Pro
210 215 220

Thr Val Thr Asp Pro Asn Thr Glu Lys Gln Gly Glu Val Phe Tyr Val
225 230 235 240

Pro Arg Asp Glu Asn Leu Gly His Leu Lys Ser Lys Asp Ala Leu Glu
245 250 255

Ile Gly Thr Lys Ser Leu Ser Gln Ile Val Gln Pro Ala Phe Glu Ser
260 265 270

Ala Phe Asp Leu Lys Ser Thr Pro Ile Glu Phe His Ser Phe Gln Asp
275 280 285

Val His Asp Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Arg Asp Val Ile
290 295 300

Ser Thr Ile Ile Pro Leu Pro Val Ile Lys Glu Leu Tyr Arg Thr Asp
305 310 315 320

Gly Gln His Ile Leu Lys Phe Pro Gln Pro His Val Val Gln Val Ser
325 330 335

Gln Ser Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met Ile Ala
340 345 350

Gly Val Asn Pro Cys Val Ile Arg Gly Leu Glu Glu Phe Pro Pro Lys
355 360 365

Ser Asn Leu Asp Pro Ala Ile Tyr Gly Asp Gln Ser Ser Lys Ile Thr
370 375 380

Ala Asp Ser Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Thr Met Asp Glu Ala Leu Gly
385 390 395 400

Ser Arg Arg Leu Phe Met Leu Asp Tyr His Asp Ile Phe Met Pro Tyr
405 410 415

Val Arg Gln Ile Asn Gln Leu Asn Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Thr Arg
420 425 430

Thr Ile Leu Phe Leu Arg Glu Asp Gly Thr Leu Lys Pro Val Ala Ile
435 440 445

Glu Leu Ser Leu Pro His Ser Ala Gly Asp Leu Ser Ala Ala Val Ser
450 455 460

Gln Val Val Leu Pro Ala Lys Glu Gly Val Glu Ser Thr Ile Trp Leu
465 470 475 480

Leu Ala Lys Ala Tyr Val Ile Val Asn Asp Ser Cys Tyr His Gln Leu
485 490 495

Met Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Ala Met Glu Pro Phe Val Ile
500 505 510

Ala Thr His Arg His Leu Ser Val Leu His Pro Ile Tyr Lys Leu Leu
515 520 525

Thr Pro His Tyr Arg Asn Asn Met Asn Ile Asn Ala Leu Ala Arg Gln
530 535 540

Ser Leu Ile Asn Ala Asn Gly Ile Ile Glu Thr Thr Phe Leu Pro Ser

12.09.03

545 550 18/27 555 560
 Lys Tyr Ser Val Glu Met Ser Ser Ala Val Tyr Lys Asn Trp Val Phe
 565 570 575
 Thr Asp Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly Val Ala Ile
 580 585 590
 Lys Asp Pro Ser Thr Pro His Gly Val Arg Leu Leu Ile Glu Asp Tyr
 595 600 605
 Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Glu Ile Trp Ala Ala Ile Lys Thr Trp
 610 615 620
 Val Gln Glu Tyr Val Pro Leu Tyr Tyr Ala Arg Asp Asp Asp Val Lys
 625 630 635 640
 Asn Asp Ser Glu Leu Gln His Trp Trp Lys Glu Ala Val Glu Lys Gly
 645 650 655
 His Gly Asp Leu Lys Asp Lys Pro Trp Trp Pro Lys Leu Gln Thr Leu
 660 665 670
 Glu Asp Leu Val Glu Val Cys Leu Ile Ile Ile Trp Ile Ala Ser Ala
 675 680 685
 Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Gly Gly Leu Ile
 690 695 700
 Met Asn Arg Pro Thr Ala Ser Arg Arg Leu Leu Pro Glu Lys Gly Thr
 705 710 715 720
 Pro Glu Tyr Glu Glu Met Ile Asn Asn His Glu Lys Ala Tyr Leu Arg
 725 730 735
 Thr Ile Thr Ser Lys Leu Pro Thr Leu Ile Ser Leu Ser Val Ile Glu
 740 745 750
 Ile Leu Ser Thr His Ala Ser Asp Glu Val Tyr Leu Gly Gln Arg Asp
 755 760 765
 Asn Pro His Trp Thr Ser Asp Ser Lys Ala Leu Gln Ala Phe Gln Lys
 770 775 780
 Phe Gly Asn Lys Leu Lys Glu Ile Glu Glu Lys Leu Val Arg Arg Asn
 785 790 795 800
 Asn Asp Pro Ser Leu Gln Gly Asn Arg Leu Gly Pro Val Gln Leu Pro
 805 810 815
 Tyr Thr Leu Leu Tyr Pro Ser Ser Glu Glu Gly Leu Thr Phe Arg Gly
 820 825 830
 Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
 835

<210> 16

<211> 865

<212> PRT

<213> glycine max

12.09.03

19/27

<400> 16

Met Phe Ser Val Pro Gly Val Ser Gly Ile Leu Asn Arg Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 His Lys Ile Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp
 20 25 30
 Phe Asn Ser Val Ala Asp Leu Thr Lys Gly Asn Val Gly Gly Leu Ile
 35 40 45
 Gly Thr Gly Leu Asn Val Val Gly Ser Thr Leu Asp Asn Leu Thr Ala
 50 55 60
 Phe Leu Gly Arg Ser Val Ala Leu Gln Leu Ile Ser Ala Thr Lys Pro
 65 70 75 80
 Leu Ala Asn Gly Lys Gly Lys Val Gly Lys Asp Thr Phe Leu Glu Gly
 85 90 95
 Ile Ile Val Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Glu Ser Ala Phe Asn
 100 105 110
 Ile Gln Phe Glu Trp Asp Glu Ser Met Gly Ile Pro Gly Ala Phe Tyr
 115 120 125
 Ile Lys Asn Tyr Met Gln Val Glu Phe Tyr Leu Lys Ser Leu Thr Leu
 130 135 140
 Glu Asp Val Pro Asn Gln Gly Thr Ile Arg Phe Val Cys Asn Ser Trp
 145 150 155 160
 Val Tyr Asn Thr Lys Leu Tyr Lys Ser Val Arg Ile Phe Phe Ala Asn
 165 170 175
 His Thr Tyr Val Pro Ser Glu Thr Pro Ala Ala Leu Val Gly Tyr Arg
 180 185 190
 Glu Glu Glu Leu Lys Asn Leu Arg Gly Asp Gly Lys Gly Glu Arg Lys
 195 200 205
 Glu His Asp Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn Asp Leu Gly Asn
 210 215 220
 Pro Asp His Gly Glu Asn Phe Ala Arg Pro Ile Leu Gly Gly Ser Ser
 225 230 235 240
 Thr His Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg Tyr Pro Thr Arg
 245 250 255
 Lys Asp Gln Asn Ser Glu Lys Pro Gly Glu Val Tyr Val Pro Arg Asp
 260 265 270
 Glu Asn Phe Gly His Leu Lys Ser Ser Asp Phe Leu Ala Tyr Gly Ile
 275 280 285
 Lys Ser Leu Ser Gln Tyr Val Leu Pro Ala Phe Glu Ser Val Phe Asp
 290 295 300
 Leu Asn Phe Thr Pro Asn Glu Phe Asp Ser Phe Gln Asp Val Arg Asp
 305 310 315 320

12.09.03

20/27
 Leu His Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Thr Glu Val Ile Ser Thr Ile
 325 330 335
 Met Pro Leu Pro Val Val Lys Glu Leu Phe Arg Thr Asp Gly Glu Gln
 340 345 350
 Val Leu Lys Phe Pro Pro Pro His Val Ile Gln Val Ser Lys Ser Ala
 355 360 365
 Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met Val Ala Gly Val Asn
 370 375 380
 Pro Cys Val Ile Arg Gly Leu Gln Glu Phe Pro Pro Lys Ser Asn Leu
 385 390 395 400
 Asp Pro Thr Ile Tyr Gly Glu Gln Thr Ser Lys Ile Thr Ala Asp Ala
 405 410 415
 Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Thr Val Asp Glu Ala Leu Ala Ser Arg Arg
 420 425 430
 Leu Phe Met Leu Asp Tyr His Asp Val Phe Met Pro Tyr Ile Arg Arg
 435 440 445
 Ile Asn Gln Thr Tyr Ala Lys Ala Tyr Ala Thr Arg Thr Ile Leu Phe
 450 455 460
 Leu Arg Glu Asn Gly Thr Leu Lys Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Leu
 465 470 475 480
 Pro His Pro Ala Gly Asp Leu Ser Gly Ala Val Ser Gln Val Ile Leu
 485 490 495
 Pro Ala Lys Glu Gly Val Glu Ser Thr Ile Trp Leu Leu Ala Lys Ala
 500 505 510
 Tyr Val Val Val Asn Asp Ser Cys Tyr His Gln Leu Met Ser His Trp
 515 520 525
 Leu Asn Thr His Ala Val Ile Glu Pro Phe Ile Ile Ala Thr Asn Arg
 530 535 540
 His Leu Ser Ala Leu His Pro Ile Tyr Lys Leu Leu Thr Pro His Tyr
 545 550 555 560
 Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala Leu Ala Arg Gln Ser Leu Ile Asn
 565 570 575
 Ala Asp Gly Ile Ile Glu Lys Ser Phe Leu Pro Ser Lys His Ser Val
 580 585 590
 Glu Met Ser Ser Ala Val Tyr Lys Asn Trp Val Phe Thr Asp Gln Ala
 595 600 605
 Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly Val Ala Ile Lys Asp Pro Ser
 610 615 620
 Ala Pro His Gly Leu Arg Leu Leu Ile Glu Asp Tyr Pro Tyr Ala Val
 625 630 635 640
 Asp Gly Leu Glu Ile Trp Ala Ala Ile Lys Thr Trp Val Gln Glu Tyr
 645 650 655
 Val Ser Leu Tyr Tyr Ala Arg Asp Asp Asp Val Lys Pro Asp Ser Glu

5

<210>	17
<211>	857
<212>	PRT
<213>	Glycine max

Met Leu Gly Gly Leu Leu His Arg Gly His Lys Ile Lys Gly Thr val
1 5 10 15

val Leu Met Arg Lys Asn val Leu Asp val Asn Ser val Thr Ser val
20 25 30

Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Leu Asp Leu val Gly Ser Thr Leu Asp
35 40 45

Thr Leu Thr Ala Phe Leu Gly Arg Ser val Ser Leu Gln Leu Ile Ser
50 55 60

12.09.03

22/27

Ala Thr Lys Ala Asp Ala Asn Gly Lys Gly Lys Leu Gly Lys Ala Thr
65 70 75 80
Phe Leu Glu Gly Ile Ile Thr Ser Leu Pro Thr Leu Gly Ala Gly Gln
85 90 95
Ser Ala Phe Lys Ile Asn Phe Glu Trp Asp Asp Gly Ser Gly Ile Pro
100 105 110
Gly Ala Phe Tyr Ile Lys Asn Phe Met Gln Thr Glu Phe Phe Leu Val
115 120 125
Ser Leu Thr Leu Glu Asp Ile Pro Asn His Gly Ser Ile His Phe Val
130 135 140
Cys Asn Ser Trp Ile Tyr Asn Ala Lys Leu Phe Lys Ser Asp Arg Ile
145 150 155 160
Phe Phe Ala Asn Gln Thr Tyr Leu Pro Ser Glu Thr Pro Ala Pro Leu
165 170 175
Val Lys Tyr Arg Glu Glu Glu Leu His Asn Leu Arg Gly Asp Gly Thr
180 185 190
Gly Glu Arg Lys Glu Trp Glu Arg Ile Tyr Asp Tyr Asp Val Tyr Asn
195 200 205
Asp Leu Gly Asp Pro Asp Lys Gly Glu Asn His Ala Arg Pro Val Leu
210 215 220
Gly Gly Asn Asp Thr Phe Pro Tyr Pro Arg Arg Gly Arg Thr Gly Arg
225 230 235 240
Lys Pro Thr Arg Lys Asp Pro Asn Ser Glu Ser Arg Ser Asn Asp Val
245 250 255
Tyr Leu Pro Arg Asp Glu Ala Phe Gly His Leu Lys Ser Ser Asp Phe
260 265 270
Leu Thr Tyr Gly Leu Lys Ser Val Ser Gln Asn Val Leu Pro Leu Leu
275 280 285
Gln Ser Ala Phe Asp Leu Asn Phe Thr Pro Arg Glu Phe Asp Ser Phe
290 295 300
Asp Glu Val His Gly Leu Tyr Ser Gly Gly Ile Lys Leu Pro Thr Asp
305 310 315 320
Ile Ile Ser Lys Ile Ser Pro Leu Pro Val Leu Lys Glu Ile Phe Arg
325 330 335
Thr Asp Gly Glu Gln Ala Leu Lys Phe Pro Pro Pro Lys Val Ile Gln
340 345 350
Val Ser Lys Ser Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met
355 360 365
Leu Ala Gly Val Asn Pro Asn Leu Ile Arg Cys Leu Lys Asp Phe Pro
370 375 380
Pro Arg Ser Lys Leu Asp Ser Gln Val Tyr Gly Asp His Thr Ser Gln
385 390 395 400

12.09.03

23/27
 Ile Thr Lys Glu His Leu Glu Pro Asn Leu Glu Gly Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Glu Ala Ile Gln Asn Lys Arg Leu Phe Leu Leu Asp His His Asp Pro
 420 425 430
 Ile Met Pro Tyr Leu Arg Arg Ile Asn Ala Thr Ser Thr Lys Ala Tyr
 435 440 445
 Ala Thr Arg Thr Ile Leu Phe Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Arg Pro
 450 455 460
 Leu Ala Ile Glu Leu Ser Leu Pro His Pro Gln Gly Asp Gln Ser Gly
 465 470 475 480
 Ala Phe Ser Gln Val Phe Leu Pro Ala Asp Glu Gly Val Glu Ser Ser
 485 490 495
 Ile Trp Leu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Val Val Asn Asp Ser Cys Tyr
 500 505 510
 His Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Val Glu Pro
 515 520 525
 Phe Ile Ile Ala Thr Asn Arg His Leu Ser Val Val His Pro Ile Tyr
 530 535 540
 Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Gly Leu
 545 550 555 560
 Ala Arg Leu Ser Leu Val Asn Asp Gly Gly Val Ile Glu Gln Thr Phe
 565 570 575
 Leu Trp Gly Arg Tyr Ser Val Glu Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Trp Val Phe Thr Asp Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly
 595 600 605
 Met Ala Ile Glu Asp Pro Ser Cys Pro His Gly Ile Arg Leu Val Ile
 610 615 620
 Glu Asp Tyr Pro Tyr Thr Val Asp Gly Leu Glu Ile Trp Asp Ala Ile
 625 630 635 640
 Lys Thr Trp Val His Glu Tyr Val Phe Leu Tyr Tyr Lys Ser Asp Asp
 645 650 655
 Thr Leu Arg Glu Asp Pro Glu Leu Gln Ala Cys Trp Lys Glu Leu Val
 660 665 670
 Glu Val Gly His Gly Asp Lys Lys Asn Glu Pro Trp Trp Pro Lys Met
 675 680 685
 Gln Thr Arg Glu Glu Leu Val Glu Ala Cys Ala Ile Ile Ile Trp Thr
 690 695 700
 Ala Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Gly
 705 710 715 720
 Gly Leu Ile Leu Asn Arg Pro Thr Leu Ser Arg Arg Phe Met Pro Glu
 725 730 735
 Lys Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Leu Arg Lys Asn Pro Gln Lys Ala

12.09.03

8

740 745 24/27 750

Tyr Leu Lys Thr Ile Thr Pro Lys Phe Gln Thr Leu Ile Asp Leu Ser
755 760 765

Val Ile Glu Ile Leu Ser Arg His Ala Ser Asp Glu Val Tyr Leu Gly
770 775 780

Glu Arg Asp Asn Pro Asn Trp Thr Ser Asp Thr Arg Ala Leu Glu Ala
785 790 795 800

Phe Lys Arg Phe Gly Asn Lys Leu Ala Gln Ile Glu Asn Lys Leu Ser
805 810 815

Glu Arg Asn Asn Asp Glu Lys Leu Arg Asn Arg Cys Gly Pro Val Gln
820 825 830

Met Pro Tyr Thr Leu Leu Leu Pro Ser Ser Lys Glu Gly Leu Thr Phe
835 840 845

Arg Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
850 855

<210> 18

<211> 864

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 18

Met Leu Gly Val Gly Gly Ile Val Ser Asp Leu Thr Gly Gly Ile Arg
1 5 10 15

Gly Ala His Leu Lys Gly Ser Val Val Leu Met Arg Lys Asn Ala Leu
20 25 30

Asp Phe Asn Asp Phe Gly Ala His Val Met Asp Gly Val Thr Glu Leu
35 40 45

Leu Gly Arg Gly Val Thr Cys Gln Leu Ile Ser Ser Thr Asn Val Asp
50 55 60

His Asn Asn Gly Gly Arg Gly Lys Val Gly Ala Glu Ala Asn Leu Glu
65 70 75 80

Gln Trp Leu Leu Pro Thr Asn Leu Pro Phe Ile Thr Thr Gly Glu Asn
85 90 95

Lys Phe Ala Val Thr Phe Asp Trp Ser Val Asp Lys Leu Gly Val Pro
100 105 110

Gly Ala Ile Ile Val Lys Asn Asn His Ala Ser Glu Phe Phe Leu Lys
115 120 125

Thr Ile Thr Leu Asp Asn Val Pro Gly Arg Gly Thr Ile Val Phe Val
130 135 140

Ala Asn Ser Trp Val Tyr Pro Gln Ala Lys Tyr Arg Tyr Asn Arg Val
145 150 155 160

12.09.03

25/27

Phe Phe Ala Asn Asp Thr Tyr Leu Pro His Gln Met Pro Ala Ala Leu
165 170 175
Lys Pro Tyr Arg Asp Asp Glu Leu Arg Asn Leu Arg Gly Asp Asp Gln
180 185 190
Gln Gly Pro Tyr Leu Asp His Asp Arg Val Tyr Arg Tyr Asp Val Tyr
195 200 205
Asn Asp Leu Gly Asp Ser Arg Asp Val Leu Gly Gly Ser Lys Asp Leu
210 215 220
Pro Tyr Pro Arg Arg Cys Arg Thr Gly Arg Lys Pro Ser Asp Ser Lys
225 230 235 240
Pro Asp His Glu Ser Arg Leu Leu Leu Leu Val Gln Asn Val Tyr Val
245 250 255
Leu Arg Asp Glu Leu Phe Gly His Leu Lys Gln Ser Asp Leu Leu Gly
260 265 270
Tyr Thr Leu Lys Gly Trp Leu Asp Gly Ile Ile Leu Ala Ile Arg Thr
275 280 285
Tyr Val Asp Leu Ser Pro Gly Glu Phe Asp Ser Phe Ala Asp Ile Leu
290 295 300
Lys Leu Tyr Glu Gly Gly Ile Lys Leu Pro Asn Ile Pro Ala Leu Glu
305 310 315 320
Glu Val Arg Lys Arg Phe Pro Leu Gln Leu Val Lys Asp Leu Ile Pro
325 330 335
Lys Gly Gly Asp Phe Leu Leu Lys Leu Pro Lys Pro Glu Ile Ile Lys
340 345 350
Val Asp Gln Lys Ala Trp Met Thr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Glu Met
355 360 365
Leu Ala Gly Val Asn Pro Met Met Ile Lys Arg Leu Thr Glu Phe Pro
370 375 380
Pro Lys Ser Thr Leu Asp Pro Ser Lys Tyr Gly Asp His Thr Ser Thr
385 390 395 400
Met Thr Glu Glu His Val Ala Lys Ser Leu Glu Gly Leu Thr Val Gln
405 410 415
Gln Ala Leu Ala Gly Asn Arg Leu Tyr Ile Val Asp Gln His Asp Asn
420 425 430
Leu Met Pro Phe Leu Ile Asp Ile Asn Asn Leu Asp Ala Ser Phe Val
435 440 445
Tyr Ala Thr Arg Thr Leu Leu Phe Leu Arg Gly Asp Gly Thr Leu Ala
450 455 460
Pro Val Ala Ile Glu Leu Ser Ser Pro Leu Ile Gln Gly Glu Leu Thr
465 470 475 480
Thr Ala Lys Ser Ala Val Tyr Thr Pro Gln His Ala Gly Val Glu Gly
485 490 495

12.09.03

26/27
 Trp Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Ala Ser Val Asn Asp Tyr Gly
 500 505 510
 Trp His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu
 515 520 525
 Pro Phe Val Ile Ala Thr Asn Arg Gln Leu Ser Val Thr His Pro Val
 530 535 540
 Tyr Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala
 545 550 555 560
 Arg Ala Arg Gly Leu Leu Ile Asn Ala Gly Gly Val Ile Glu Met Thr
 565 570 575
 Val Phe Pro His Lys His Ala Met Pro Met Ser Ser Met Val Tyr Lys
 580 585 590
 His Trp Asn Phe Thr Glu Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg
 595 600 605
 Gly Met Ala Val Glu Asp Ala Ser Ser Pro His Lys Val Arg Leu Leu
 610 615 620
 Ile Lys Asp Tyr Pro Tyr Ala Thr Asp Gly Leu Ala Val Trp Asp Ala
 625 630 635 640
 Ile Glu Gln Trp Val Ser Asp Tyr Leu Thr Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp
 645 650 655
 Gly Val Leu Gln Gly Asp Val Glu Leu Gln Ala Trp Trp Lys Glu Val
 660 665 670
 Arg Glu Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Ala Trp Trp Pro Lys
 675 680 685
 Met Gln Thr Val Ala Glu Leu Ile Lys Ala Cys Ala Thr Ile Ile Trp
 690 695 700
 Thr Gly Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr
 705 710 715 720
 Ser Gly Tyr His Pro Asn Lys Pro Ser Ala Ser Arg Arg Pro Met Pro
 725 730 735
 Val Gln Gly Ser Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Lys
 740 745 750
 Ala Phe Ile Arg Thr Ile Thr Ser Gln Phe His Ala Leu Val Gly Ile
 755 760 765
 Ser Leu Met Glu Ile Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Val Tyr Leu
 770 775 780
 Gly Gln His Asp Thr Pro Ala Trp Thr Ser Asp Ala Lys Ala Leu Glu
 785 790 795 800
 Ala Phe Lys Arg Phe Gly Ala Lys Leu Glu Gly Ile Glu Lys Gln Val
 805 810 815
 Val Ala Met Asn Ser Asp Pro Gln Leu Lys Asn Arg Thr Gly Pro Ala
 820 825 830
 Lys Phe Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Thr Gly

12:09:03

27/27

835

840

845

Gln Ala Glu Gly Leu Thr Ala Arg Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
850 855 860