

64.145/SZE

KIVONAT

Növényekből származó elágazást megszüntető enzimeket kódoló DNS molekulák

Hoechst Schering AgrEvo GmbH, BERLIN, DE

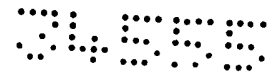
A bejelentés napja: 1995. 12. 22.

Elsőbbsége: 1994. 12. 22. (P 44 47 387.7) DE

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP95/05091

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/19581

A jelen találmány olyan DNS molekulákat ír le, melyek egy elágazást megszüntető enzim biológiai aktivitásával rendelkező növényi proteinek kódolnak. Ezenkívül, leírásra kerülnek olyan transzgenikus növényi sejtek és növények is, melyek csökkentett vagy megnövekedett elágazást megszüntető enzim aktivitással rendelkeznek, valamint az említett sejtekből és növényekből módosított keményítő izolálható.



64.145/SZE

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Növényekből származó elágazást megszüntető enzimeket kódoló DNS molekulák

Hoechst Schering AgrEvo GmbH, BERLIN, DE

Feltalálók: KOSSMANN Jens, BERLIN, DE

EMMERMANN Michael, BERLIN, DE

VIRGIN Ivar, STOCKHOLM, SE

RENZ Andreas, BAYREUTH, DE

A bejelentés napja: 1995. 12. 22.

Elsőbbsége: 1994. 12. 22. (P 44 47 387.7) DE

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP95/05091

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/19581

A jelen találmány egy elágazást megszüntető enzim (R enzim) enzimatisz aktivitásával rendelkező növényekből származó proteineket kódoló DNS molekulákkal kapcsolatos. A jelen találmány továbbá kapcsolatos a növényekben szintetizált amilopektin elágazásának módosítására szolgáló eljárással is, valamint

olyan növényekkel és növényi sejtekkel, melyekben módosított elágazási fokú amilopektin szintetizálódik egy további elágazást megszüntető enzim aktivitásának vagy egy endogén elágazást megszüntető enzim aktivitás gátlása expressziójának köszönhetően, valamint az említett növényi sejtekből és növényekből nyerhető keményítővel.

A keményítő fontos szerepet játszik egy sor növény raktározó anyagaként, valamint reprodukzív, kereskedelmi szempontból hasznos nyersanyagként és jelentősége egyre nő. A keményítő ipari alkalmazásához szükség van arra, hogy a keményítő megfeleljen a feldolgozó ipar követelményeinek a keményítő szerkezetét, formáját és/vagy egyéb fiziko-kémiai paramétereit tekintve. A lehető legtöbb területen való hasznosításhoz a keményítő a lehető legtöbb formában kell kinyerhető legyen.

Míg a poliszacharid keményítő kémiaileg egységes alkotórészekből áll, a glükóz molekulákból, ez különböző molekula formák komplex keveréke, mely különbségeket mutat a polimerizáció foka és az elágazások jelenlétét tekintve. Megkülönböztethető az amilóz keményítő, az amilopektin keményítóből származó alfa-1,4 glükozidosan kapcsolódó glükóz molekulák egy alapjában véve elágazás mentes polimere, egy elágazó polimer, melynek elágazásai a további alfa-1,6 glükózidos kötések eredményei.

A kifejezetten keményítő termelésre használt növényekben, például a kukoricában vagy a burgonyában, mind a két keményítő forma jelen van 25 rész amilóz : 75 rész amilopektin arányban. Az amilopektinen túl a kukorica például egy másik elágazó poliszacharidot tartalmaz, az úgynevezett fitoglikogént, ami az amilopektintől abban tér el, hogy magasabb az elágazási foka és különböző az oldékonysága (lásd például Lee et al., Arch. Biochem. Biophys. 143 (1971), 365-374; Pan and Nelson, Plant Physiol. 74 (1984), 324-328). A jelen találmányban az amilopektin kifejezésen fitoglikogént értünk.

A keményítő alapvető vegyülete uniformitásának tekintetében ipari alkalmazásához a keményítő termelő növényektől elvárják, hogy például vagy csak amilopektin alkotórészeket vagy csak amilóz alkotórészeket tartalmazzanak. Más alkalmazásokhoz a növényel szemben követelmény, hogy különböző elágazási fokú amilopektin formákat szintetizáljon.

Ilyen növények hozhatók létre például nemesítéssel vagy mutagenézises technikákkal. Bizonyos növény fajokról, például a kukoricáról, ismert, hogy a mutagenézis felhasználható csupán amilopektint termelő változatok létrehozására. Burgonya esetében kémiai mutagenézissel egy genotípust hoztak létre egy haploid vonalhoz, mely nem termel amilózt (Hovenkamp-Hermelink, Theor. Appl. Genet. 75 (1987), 217-221). A haploid vonalak azonban vagy az ezekből származó homozigóta diploid vagy tetraploid vonalak nem megfelelőek mezőgazdasági célokra. A mutagenézises technikák azonban, nem alkalmazhatók a tetraploid vonalak esetében, melyek viszont a mezőgazdaság számára érdekesek, mivel a négy különböző genotípus jelenléte miatt egy gén összes kópiájának inaktiválása technikailag nem megvalósítható. Ezért, burgonya esetében más technikákat kell alkalmazni, például a növények specifikus génszabályozási módosítását.

Például Visser és munkatársaitól (Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 289) és a WO 92/11376 szabadalomból ismert, hogy a keményítő szemcséhez kötött keményítő szintetáz gén antisense gátlásával burgonyában olyan változatok hozhatók létre, melyek lényegében tiszta amilopektin keményítőt szintetizálnak.

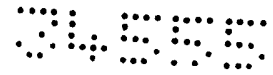
A WO 92/14827 szabadalom elágaztató enzimet (Q enzim) kódoló DNS szekvenciákat ír le, melyek alfa-1,6 elágazásokat juttatnak be az amilopektin keményítőbe. Ezekkel a DNS szekvenciákkal lehetőség van olyan transzgenikus növények létrehozására, melyek módosított amilóz/amilopektin arányú keményítőt tartalmaznak.

Azért, hogy még specifikusabban módosíthassuk a növényekben szintetizálódott keményítő elágazási fokát génszabályozási eljárásokat használva, szükség van az olyan enzimeket kódoló DNS szekvenciák azonosítására, melyek részt vesznek a keményítő metabolizmusban, különösen a keményítő molekulák elágaztatásában részt vevő enzimekét.

A keményítő molekulákba elágazásokat bejuttatni képes Q enzimeken túl a növények olyan enzimeket is tartalmaznak, melyek képesek az elágazásokat megszüntetni. Ezekre az enzimekre elágazást megszüntető enzimekként utalunk és szubsztrát specifitásuk tekintetében három csoportra osztjuk ezeket:

- (a) Pullulanázok, melyek az amilopektint használják szubsztrátként a pullulánon kívül, olyan mikroorganizmusokban található, mint például a *Klebsiella*, valamint a növények. Növényekben ezekre az enzimekre gyakran utalunk R enzimekként.
- (b) Izoamilázok, melyek nem a pullulánt, hanem a glikogént és az amilopektint használják szubsztrátként, szintén megtalálhatók mikroorganizmusokban és növényekben. Izoamilázokat írtak le például kukoricából (Manners and Rowe, Carbohydr. Res. 9 (1969), 107) és burgonyából (Ishizaki et al., Agric. Biol. Chem. 47 (1983), 771-779).
- (c) Az Amilo-1,6-glikozidázokat emlősök és élesztőgombák esetében írták le és a határ dextrineket használják szubsztrátként.

Li és munkatársai (Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284) cukorrépában csupán egyetlen pullulanáz típusú elágazást megszüntető enzimet detektáltak öt endoamiláz és két exoamiláz enzimen kívül. Miután mérete körülbelül 100 kD és pH optimuma 5,5, ez az enzim a kloroplasztiszokban helyezkedik el. Spenót esetében szintén két elágazást megszüntető enzimet írtak le, melyek szubsztrátként a pullulánt használják. A spenót elágazást megszüntető enzimjei és a cukorrépa enzimjei olyan



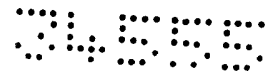
aktivitással rendelkeznek, melyek 5 faktorral alacsonyabbak, ha az amilopektinnel reagálnak szubsztrátként a pullulán helyett (Ludwig et al., *Plant. Physiol.* 74 (1984), 856-861; Li et al., *Plant. Physiol.* 98 (1992), 1277-1284).

Egy elágazást megszüntető enzim aktivitását Hobson és munkatársai (*J. Chem. Soc.* (1951), 1451) vizsgálták burgonya esetében, mely egy keményítő-raktározó termesztett növény, mely mezőgazdasági szempontból is fontos növény. Sikerült biztosítani, hogy a megfelelő enzim - a Q enzimmel szemben - nem rendelkezik lánc meghosszabbító tulajdonsággal, csupán az alfa-1,6 glikozidos kötések hidrolizálja. Azonban nem tudták részletesebben jellemezni az enzimet.

A burgonyához az elágazást megszüntető enzim tisztítására szolgáló eljárás és a tisztított protein részleges peptid szekvenciája is felvetődött már (Német szabadalmi alkalmazás P 43 27 165.0 és PCT/EP94/026239). Elméletileg, lehetséges kellene legyen a megfelelő proteinek kódoló DNS szekvenciák azonosítása ismert peptid szekvenciák segítségével ha degenerált oligonukleotid próbákat használunk. Azonban gyakorlatilag gyakran merül fel az a probléma, hogy a próba degeneráltsági foka túl magas vagy a próba túl rövid a kívánt proteint kódoló szekvenciák specifikus azonosításához.

A burgonya elágazást megszüntető enzimjének javasolt peptid szekvenciája ismerete ellenére a kutatók ezideig nem tudták a növények elágazást megszüntető enzimjét kódoló DNS molekulákat izolálni a degenerált oligonukleotidokhoz való hibridizációval vagy más genetikai vagy immunológiai megközelítésekkel, mint például amilyeneket a P 43 27 165.0 Német szabadalmi alkalmazás ad meg.

Spenót esetében sem - mely növénynél az elágazást megszüntető enzim tisztítását Ludwig és munkatársai leírták (*Plant Physiol.* 74 (1984), 856-861) - tudták a kutatók meghatározni a peptid szekvenciát vagy az említett proteint kódoló DNS molekulákat azonosítani.



A jelen találmány problémáját így az olyan DNS molekulák biztosítása jelenti, melyek olyan növényi proteinek kódolnak, melyek egy elágazást megszüntető enzim aktivitásával rendelkeznek és lehetővé teszik transzgenikus növényi sejtek és olyan növények létrehozását, melyek egy elágazást megszüntető enzim fokozott vagy csökkentett aktivitásával rendelkeznek.

A problémát az igénypontokban lírt megvalósulások biztosításával oldjuk meg.

A jelen találmány így olyan növényi proteinek kódoló DNS molekulákkal kapcsolatos, melyek egy elágazást megszüntető enzim enzimatis aktivitásával rendelkeznek, vagy ennek egy biológiailag aktív fragmentjével.

Egy ilyen DNS molekula előnyösen egy növényi elágazást megszüntető enzimet kódol, melynek szekvenciáját a 18. vagy 24. számú szekvenciában mutatjuk be. Még előnyösebben egy ilyen DNS molekula a 17. számú szekvenciában vagy a 23. számú szekvenciában bemutatott nukleotid szekvenciát tartalmazza, különösen ezek kódoló régióját.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá, az olyan DNS molekulák, melyek egy elágazást megszüntető enzim biológiai aktivitásával rendelkező növényi proteinek kódolnak, vagy ezek egy biológiailag aktív fragmentjét, és melyek a fent leírt bármelyik DNS molekulához hibridizálódnak.

A "hibridizáció" fogalma ebben a szöveg összefüggésben hagyományos hibridizációs körülmények közötti hibridizációt jelent, előnyösen olyan szigorú körülmények közötti hibridizációt, melyet például Sambrook és munkatársai írnak le (1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). A jelen találmány DNS molekuláihoz hibridizálódó DNS molekulák elméletileg származhatnak bármilyen olyan növényből, mely ilyen DNS molekulával rendelkezik. Előnyösen, ezek egyszikű vagy kétszikű

növényekből származnak, előnyösen haszonnövényekből, és még előnyösebben keményítőt raktározó növényekből.

A jelen találmány DNS molekuláihoz hibridizálódó DNS molekulák izolálhatók, például különböző növények genom könyvtáraiból vagy cDNS könyvtáraiból.

A növényekből származó ilyen DNS molekulák azonosíthatók és izolálhatók a jelen találmány DNS molekuláinak használatával vagy ezen molekulák fragmentjeivel, vagy ezen molekulák reverz komplementjeivel, például standard technikáknak megfelelően történő hibridizációval (lásd például Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Hibridizációs próbaként például olyan DNS molekulák használhatók, melyek lényegében azonosak a 17. számú szekvenciában vagy a 23. számú szekvenciában jelzett DNS szekvenciákkal vagy az említett szekvenciák fragmentjeivel. A hibridizációs próbaként használt DNS fragmentek lehetnek szintetikus, hagyományos DNS szintézises technikák segítségével létrehozott DNS fragmentek, melyek szekvenciája lényegében azonos a jelen találmány szerinti DNS molekulák DNS szekvenciájával. Ha a jelen találmány DNS molekuláihoz hibridizálódó géneket azonosítottuk és izoláltuk, szükséges meghatározni szekvenciájukat és az említett szekvencia által kódolt proteinek tulajdonságait analizálni.

A "hibridizálódó DNS molekulák" kifejezés a fent leírt DNS molekulák fragmentjeit, származékait és allél variánsait foglalják magukba, melyek a fent leírt proteint vagy ennek egy biológiailag aktív fragmentjét kódolják. A fragmenteket úgy ismerjük, mint a DNS molekulák olyan részeit, melyek elegendő hosszúságúak ahhoz, hogy a leírt proteint vagy annak egy biológiailag aktív fragmentjét kódolják. A "származék" kifejezés ebben a szöveg összefüggésben azt jelenti, hogy ezen molekulák DNS szekvenciája egy vagy több pozícióban tér el a fent leírt DNS



molekulák szekvenciájától és erős homológiát mutatnak az említett DNS molekulával. A homológián azt értjük, hogy a szekvencia azonosság legalább 40%-os, különösen legalább 60%-os, még előnyösebben legalább 80%-os és még előnyösebben legalább 90%-os. A fent leírt DNS molekuláktól való eltérés lehet deléció, szubsztitúció, inzertáció, addíció vagy rekombináció eredménye. A homológia a továbbiakban azt jelenti, hogy a megfelelő DNS szekvenciák vagy a kódolt proteinek funkcionálisan és/vagy strukturálisan is azonosak. A fent leírt DNS molekulákkal homológ DNS molekulák, valamint az említett DNS molekulák származékai gyakran az említett DNS molekulák variációi, melyek azonos biológiai funkció módosításait képviselik. Ezek lehetnek természetesen előforduló variációk, mint például más növény fajok szekvenciái, vagy mutációk. Ezek a mutációk bekövetkezhetnek a természetben, vagy elérhetők specifikus mutagenézis révén. Ezenkívül, ezek a variációk lehetnek szintetikus létrehozott szekvenciák is.

Az allál variánsok lehetnek természetesen előforduló variánsok, valamint szintetikus létrehozott vagy génszintézisével létrehozott variánsok.

A jelen találmány DNS molekuláinak különböző variánsai által kódolt proteinek specifikus közös tulajdonságokkal rendelkeznek, mint például enzimatis aktivitással, molekulatömeggel, immunológiai reaktivitással, konformációval stb., valamint fizikai tulajdonságokkal, mint például elektroforetikus mobilitással, kromatográfiás viselkedéssel, szedimentációs koefficienssel, oldékonysággal, spektroszkópos tulajdonságokkal, stabilitással, pH optimummal, hőmérséklet optimummal, stb.

Az elágazást megszüntető enzim enzimatis aktivitása egy jó festési teszttel detektálható az 5. példában leírtaknak megfelelően. Ez a teszt arra a megállapításra alapul, hogy egy keményítő módosítási képességgel rendelkező protein úgy detektálható, hogy a protein extraktumokat szeparáljuk, például

gumókból, nem denaturáló amilopektint tartalmazó poliakrilamid géleken (PAAG) majd ezt követően megfestjük a gél megfelelő pufferben való inkubálás után jóddal. Míg a nem elágazó amilóz kék komplexet képez a jóddal, az amilopektin vöröses-bíbor elszíneződést eredményez. A vöröses-bíbor színt adó amilopektin tartalmú poliakrilamid gélek jóddal való reagáltatása színváltozást eredményez, a gél kékre színeződik azokon a helyeken, ahol az elágazást megszüntető aktivitás található, miután a bíbor-festődésű amilopektin elágazásait az elágazást megszüntető enzim megemésztí.

Másik lehetőségként az elágazást megszüntető enzim aktivitás detektálható DNSS teszttel (lásd Ludwig et al., *Plant., Physiol.* 74 (1984), 856-861).

A jelen találmány továbbá kapcsolatos még olyan DNS molekulákkal, melyek szekvenciája eltér a fent leírt DNS molekulák szekvenciájától a genetikai kód degeneráltsága következtében, valamint melyek egy elágazást megszüntető enzim biológiai aktivitásával rendelkező növényi proteint, vagy annak egy biológiailag aktív fragmentjét kódolják.

Egy előnyben részesített megvalósulás szerint a jelen találmány szerinti DNS molekulák által kódolt protein legalább egy az 1. - 14. számú szekvenciákban leírt peptid szekvenciát tartalmaz.

Egy másik előnyben részesített megvalósulás szerint a jelen találmány szerinti DNS molekulák által kódolt növényi elágazást megszüntető enzimek izolálhatók növényi protein kivonatokból frakcionált ammónium szulfátos kicsapatással és ezt követő affinitás kromatográfiával béta-ciklodextrinen.

Előnyösen, a jelen találmány DNS molekulái olyan proteineket kódolnak, melyek 50 - 150 kD molekulásúlyúak SDS gél elektroforézissel, előnyösen 70 - 130 kD és még előnyösebben 90-110 kD közöttiek.



Elméletileg a jelen találmány szerinti DNS molekulák származhatnak bármilyen olyan növényből, mely expresszálja a leírt proteinekét, előnyösen taxonómiai magassabbrendű növényekből, különösen egyszikű vagy kétszikű növényekből, előnyösen olyan növényekből, melyek keményítőt szintetizálnak. Leginkább például a gabonák (mint például az árpa, a rozs, a zab, a búza stb) a kukorica, a rizs, a borsó, a kaszava stb részesülnek előnyben.

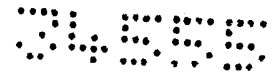
Egy előnyben részesített megvalósulásban a jelen találmány DNS molekulái a *Solanaceae* családba tartozó növényekből származnak, vagy a *Chenopodiaceae* családba tartozó növényekből, előnyösen a *Solanum tuberosum*-ból, vagy a *Spinacia oleracea*-ből.

A jelen találmány továbbá vonatkozik vektorokra, különösen plazmidokra, kozmidokra, vírusokra, bakteriofágokra és más olyan a génszerkezeten hagyományos vektorokra, melyek a jelen találmány DNS molekuláit tartalmazzák.

A jelen találmány előnyben részesített megvalósulása szerint a vektorokban tartalmazott DNS molekulák szabályozó DNS szekvenciákhoz kapcsolódnak lehetővé téve a prokarióta vagy eukarióta sejtekben való transzkripciót és translációt.

A jelen találmány egy másik előnyben részesített megvalósulása szerint a találmány gazdasejtekre is vonatkozik, különösen prokarióta vagy eukarióta sejtekre, melyeket a fent leírt DNS molekulával vagy vektorral transzformáltunk és az ilyen gazdasejtekből származó sejtekre.

Ezenkívül, a jelen találmány vonatkozik egy elágazást megszüntető enzim biológiai aktivitásával rendelkező növényi protein vagy egy biológiailag aktív fragmentje előállítására szolgáló módszerre, ahol a jelen találmány szerinti gazdasejtet megfelelő körülmények között tenyésztjük és a tenyészetből a proteint kinyerjük.



A jelen találmány egy másik tárgyát képezik az említett eljárással nyerhető proteinek.

A találmány ezenkívül vonatkozik még egy elágazást megszüntető enzim biológiai aktivitásával rendelkező növényi proteinekre is, melyeket a találmány DNS molekulái kódolnak, kivéve a már leírt spenótból és burgonyából nyert proteineket.

A jelen találmány DNS molekuláinak biztosításával lehetőség nyílt a növényi sejtek génszerkezeti manipulálására úgy, hogy ezek megnövekedett vagy csökkent elágazást megszüntető enzim aktivitással rendelkeznek a vad típusú sejtekhez viszonyítva. Egy ilyen módosított keményítő különböző célokra használható.

Egy előnyben részesített megvalósulás szerint a találmány gazdasejtjei transzgenikus növényi sejtek, melyek megnövekedett elágazást megszüntető enzim aktivitással rendelkeznek a nem transzformált sejtekhez képest a jelen találmány egy hozzáadott, bejuttatott DNS molekulájának jelenléte és expressziója következtében.

A jelen találmány egy másik tárgyát képezik a fent leírt transzgenikus növényi sejteket tartalmazó transzgenikus növények.

A jelen találmány továbbá vonatkozik a transzgenikus növényi sejtekből vagy növényekből nyerhető keményítőre is. A fokozott elágazást megszüntető enzim aktivitásnak köszönhetően a transzgenikus sejtek vagy növények által szintetizált amilopektin keményítő a nem transzformált növények által termelt keményítő tulajdonságaitól eltérő tulajdonságokkal rendelkezik. Például ha ezen keményítő vizes oldatának viszkozitását analizáljuk kezelés során, ezek maximális viszkozitása alacsonyabb, mint a nem transzformált növények keményítőjének viszkozitása. Előnyösen a maximális viszkozitási érték legalább 40%-kal, előnyösen legalább 55%-kal és még előnyösebben legalább 65%-kal csökken a vad típusú növényekből származó keményítő maximális viszkozitásához hasonlítva. Ezenkívül, a módosított keményítő vizes oldatának végső viszkozitása hűtés után magasabb, mint a vad

típusú keményítőé. Előnyösen a végső viszkozitás legalább 10%-kal, előnyösen legalább 30%-kal, és még előnyösebben legalább 50%-kal magasabb, mint a vad típusú növényekből származó keményítőé.

Ezenkívül, a módosított keményítőt tartalmazó gélek stabilitása magasabb, mint a vad típusú keményítőt tartalmazó géleké. A gélek deformálásához szükséges erő legalább 2,5-szer, előnyösen legalább 3,5-ször és még előnyösebben legalább 5,5-ször nagyobb kell legyen, mint a vad típusú keményítőt tartalmazó gélek deformálásához szükséges erő.

A jelen találmány egy további tárgyát képezi az élelmiszeripari és ipari termékek előállításához való leírt keményítő használata.

A jelen találmány egy másik tárgyát képezi a jelen találmány növényi anyagainak szaporítása, például magok, termések, dugványok, gumók, gyökérek, stb., és ez a szaporító anyag a fent leírt transzgenikus növényi sejteket tartalmazza.

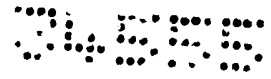
A jelen találmány a továbbiakban olyan transzgenikus növényi sejtekkel is kapcsolatos, melyekben az elágazást megszüntető enzim aktivitása az elágazást megszüntető enzimet kódoló endogén nukleinsav molekulák transzkripciója vagy translációja gátlásának köszönhető. Ezt előnyösen úgy érjük el, hogy a jelen találmány DNS molekuláját antisense irányban expresszáljuk a megfelelő növényi sejtekben. Az antisense hatásnak köszönhetően, az elágazást megszüntető enzim aktivitása csökken. Az elágazást megszüntető enzim aktivitás csökkentésének egy másik lehetősége növényi sejtekben a megfelelő ribozimok - melyek specifikusan hasítják a jelen találmány DNS molekuláinak transzkriptjeit - expresszálása. Az ilyen ribozimek termelése a jelen találmány DNS molekuláinak felhasználásával ismert a tudomány e területén. Másik lehetőségként a növényi sejtekben az elágazást megszüntető enzim aktivitás csökkenthető ko-szuppressziós hatással is.

A jelen találmány ezenkívül kapcsolatos csökkent elágazást megszüntető enzim aktivitással rendelkező fent leírt transzgenikus növényi sejteket tartalmazó transzgenikus növényekkel is. A jelen találmány egy további tárgyát képezik a transzgenikus sejtekből vagy növényekből nyerhető módosított keményítő is. A transzgenikus sejtek és növények amilopketin keményítője megváltozott elágazási fokot mutat a nem transzformált növények keményítőjéhez képest a csökkent elágazást megszüntető enzim aktivitásnak köszönhetően. Ezenkívül, a leírt transzgenikus növényekből nyerhető módosított keményítő több szempontból is eltérhet a vad típusú növények keményítőjétől. Például, ha ezen keményítő vizes oldatának viszkozitását analizáljuk hevítés hatására, olyan maximális viszkozitás mutatnak, mely alacsonyabb, mint a nem transzgenikus növényekből származó keményítőé. Előnyösen, a maximális viszkozitás értéke legalább 35%-kal, előnyösen legalább 40%-kal és még előnyösebben legalább 50%-kal csökken a vad típusú növényekből származó keményítő maximális viszkozitásához képest.

A csökkent elágazást megszüntető enzim aktivitással rendelkező növények által szintetizált módosított keményítő keményítő szemcséi lehetnek durva, repedezett, vagy horzsoltszerű felületű.

Ezenkívül, a módosított keményítőt úgy jellemezzük, hogy az ezen keményítőből készült gél stabilabb, mint a vad típusú keményítőből készült gélek. A módosított keményítőből készült gélek deformálásához szükséges erő legalább 2,3-szor, előnyösen, legalább 3,8-szor és még előnyösebben legalább 6,0-szor nagyobb, mint a vad típusú keményítőt tartalmazó gélek deformálásához szükséges erő.

A módosított keményítő foszfát tartalma előnyösen magasabb, mint a vad típusú keményítőé. A foszfát tartalomban bekövetkező növekedés az elágazást megszüntető enzim aktivitás csökkenésének mértékétől függ. Előnyösen, a foszfát



tartalom legalább 15%-kal, még előnyösebben legalább 25%-kal és még előnyösebben legalább 60%-kal magasabb, mint a vad típusú keményítőé.

A jelen találmány egy másik tárgyát képezi a leírt keményítő élelmiszeripari és ipari termékek előállításában való használata.

A jelen találmány kapcsolatos a fent leírt transzgenikus növények szaporító anyagával is, mint például magokkal, termésekkel, dugványokkal, gumókkal, gyökértörzsek, stb., a szaporító anyag a fent leírt transzgenikus növényi sejteket tartalmazza.

Előállíthatók, olyan transzgenikus növényi sejtek, melyek az elágazást megszüntető enzim hozzáadott expressziójának köszönhetően módosult elágazási fokkal rendelkező amilopektint hoznak létre a vad típusú növények által szintetizált amilopektin keményítőhöz viszonyítva, például egy olyan folyamat segítségével, mely a következő lépésekből áll:

(a) a következő DNS szekvenciákat tartalmazó expressziós kazetta előállítása:

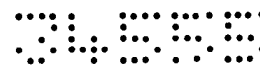
(i) egy növényi sejtekben a transzkripciót lehetővé tevő promotert;

(ii) egy elágazást megszüntető enzim enzimatis aktivitásával rendelkező proteint kódoló legalább egy DNS szekvenciát, mely a sense orientációban levő promóter 3' végéhez van fúzionáltatva; és

(iii) tetszés szerint a transzkripció terminációjához való terminációs jelet, valamint egy a létrejött transzkripthez egy poli-A farok hozzáadását, mely a kódoló régió 3' végéhez kapcsolódik; és

(b) növényi sejtek az (a) lépésben létrehozott expressziós kazettával való transzformációját.

Előállíthatók, olyan transzgenikus növényi sejtek, melyek az elágazást megszüntető enzim csökkentett aktivitásának köszönhetően módosult elágazási fokkal rendelkező amilopektint hoznak létre a vad típusú növények által szintetizált



amilopektin keményítőhöz viszonyítva, például egy olyan folyamat segítségével, mely a következő lépésekből áll:

(a) a következő DNS szekvenciákat tartalmazó expressziós kazetta előállítása:

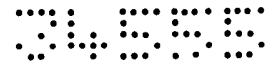
(i) egy növényi sejtekben a transzkripciót lehetővé tevő promotert;

(ii) egy elágazást megszüntető enzim enzimatis aktivitásával rendelkező proteint kódoló legalább egy DNS szekvenciát, vagy egy ilyen protein legalább egy részét, mely az antisense orientációban levő promóter 3' végéhez van fúzionáltatva; és

(iii) tetszés szerint a transzkripció terminációjához való terminációs jelet, valamint a létrejött transzkripthez egy poli-A farok hozzáadását, mely a (ii) részben leírt DNS szekvencia 3' végéhez kapcsolódik; és

(b) növényi sejtek az (a) lépésben létrehozott expressziós kazettával való transzformációját.

Elméletileg, bármilyen a növényekben funkcionáló promóter felhasználható az (I) pontban említett promoterként. A promóter lehet homológ vagy heterológ a használt növény fajta tekintve. Egy megfelelő promóter, például a karfiol mozaik vírus 35S promotere (Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812), mely lehetővé teszi egy növény összes szövetében a konstitutív expressziót és a WO 94/01571 szabadalomban leírt promóter szerkezet. Azonban, olyan promóterek is felhasználhatók, melyek csupán külső faktorok által meghatározott időpontban (lásd például a WO 93/07179), vagy a növény bizonyos szövetében (lásd például Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2245-2251) későbbi szekvenciák expressziójához vezetnek. Előnyösen, olyan promótereket használunk, melyek aktívak a transzformálandó növények keményítő-raktározó szerveiben. Ezek a keményítő-raktározó szervek például a kukorica szemcsék a kukoricában, burgonyában pedig a gumó. A burgonya transzformálásához a gumó specifikus B33



promótert (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) részesítjük előnyben de, nem kizárólagosan használjuk.

Feltételezve, hogy a folyamat (a) lépése (ii) pontjában egy elágazást megszüntető enzim enzimikus aktivitásával rendelkező, említett DNS szekvencia a promóterhez sense orientációban kapcsolódik, ez a DNS szekvencia natív vagy homológ eredetű lehet vagy idegen vagy heterológ eredetű a transzformálandó növényt tekintve.

Előnyben részesítjük a jelen találmány DNS molekuláinak használatát. Elméletileg a szintetizált protein a növényi sejt bármely alkotójában lokalizálódhat. A növények elágazást megszüntető enzimeit általában a plasztiszokban lokalizálják és így az ezen alkotókban való transzlokációhoz tartalmaznak jel szekvenciát. A 17. számú szekvenciában leírt aminosav szekvencia esetében a jel szekvencia 64 N-terminális aminosavból áll. A sejt egy másik alkotójában való lokalizációjához a jel szekvenciát kódoló DNS szekvenciát el kell távolítani és a kódoló régiót a DNS szekvenciához kell kapcsolni, hogy a megfelelő alkotóban való lokalizációt lehetővé tegyünk. Az ilyen szekvenciák ismertek (lásd például Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Feltéve, hogy a folyamat (a) lépése (ii) pontjában említett, egy elágazást megszüntető enzim enzimikus aktivitásával rendelkező proteint kódoló DNS szekvencia antisense orientációban kötődik a promóterhez, ez a DNS szekvencia előnyösen homológ eredetű a transzformálandó növényvel. Azonban olyan DNS szekvenciák is használhatók, melyek endogén módon jelenlevő elágazást megszüntető enzim génekkel mutatnak magas fokú homológiát, különösen 80% feletti, előnyösen 90% feletti és 100% feletti, legelőnyösebben 95% feletti homológiát.



Minimálisan legalább 15 bázispár hosszúságú szekvenciák használhatók. A gátló hatás, azonban nem zárható ki, még a rövidebb szekvenciák használatakor sem. A hosszabb szekvenciák részesülnek előnyben, melyek 100-500 bázispár hosszúságúak; egy hatékony anti-sense gátláshoz az 500 bázispárnál hosszabb szekvenciák használatát részesítjük előnyben. Általában olyan szekvenciákat használunk, melyek 5000 bázispárnál rövidebbek, előnyösen 2500 bázispárnál rövidebb szekvenciákat.

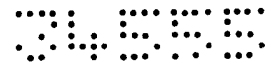
A burgonya transzformációja esetében a DNS szekvencia előnyösen a 23. számú szekvenciában leírt DNS szekvencia, vagy ennek részei, melyek egy anti-sense hatás kiváltásához elegendő hosszúságúak.

A növényi sejtekben való transzkripcióhoz való terminációs jelek leírásra kerültek és szabadon felcserélhetők. Például, az *Agrobacterium tumefaciens*-ből származó oktopin szintetáz gén terminációs szekvenciája is felhasználható.

A folyamat (a) lépése szerint megszerkesztett expressziós kazetta növényi sejtbe való transzferálását előnyösen plazmidokat használva valósítjuk meg, különösen olyan plazmidokat használva, melyek az expressziós kazetta növényi genomba való stabil integrálódását teszik lehetővé.

Elméletileg, a fent leírt eljárás az összes növény faj esetében használható. érdeklődésre tartanak számot az egyszikű és a kétszikű növények. A különböző egyszikű és kétszikű növények esetében használt transzformálási technikákat már leírták. Az eljárásokat előnyösen haszonnövények esetében használjuk, különösen keményítőt termelő növények esetében, mint például gabonák (kukorica, búza, árpa, rozs, zab), burgonya, borsó, rizs, kaszava, stb. esetében.

Az idegen gének magasabbrendű növényekbe való bejuttatásának megvalósításához széleskörű klónozó vektorok állnak rendelkezésre, melyek tartalmazzák az *E. coli*-hoz való replikációs origót és a transzformált bakteriális sejt



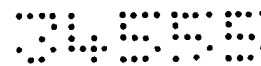
szelekciójához való marker gént. Ilyen vektorokra példák a pBR322, a pUC sorozat, az m13mp sorozat, a pACYC184, stb. A kívánt szekvencia a vektorba a megfelelő restrikciós helynél juttatható be. A kapott plazmidot *E. coli* sejtek transzformálására használjuk. A transzformált *E. coli* sejteket egy megfelelő tápközegben tenyésztjük, összegyűjtjük és lizáljuk. A plazmidot standard technikáknak megfelelően nyerjük ki. A nyert plazmid jellemzéséhez használt analízises módszerként a DNS restrikciós analízist és a szekvencia analízist használjuk általában. Az egyes műveletek után a plazmid DNS hasítható és a kapott DNS fragment más DNS szekvenciákhoz köthető.

Nagy számú technika áll rendelkezésre a DNS növényi gazdasejtbe való bejuttatására. Ezen technikák közé tartoznak a növényi sejtek transzformálása T-DNS-sel *Agrobacterium tumefaciens*-t vagy *Agrobacterium rhizogenes*-t használva transzformánsként, protoplasztok fúziójával, a DNS injektálásával és elektroporációjával, DNS biolisztikus technikával és más lehetséges technikákkal történő bejuttatásával.

A DNS növényi sejtekbe való injektálása és elektroporációja esetében, nincs specifikus igény az alkalmazott plazmidokkal szemben. Egyszerű plazmidok, mint a pUC származékok is felhasználhatók. Azonban, ha teljes növény regeneráltatása a cél a megfelelő transzformált sejtekből, szükség van egy szelektálható marker gén jelenlétére.

A kívánt gének növényi sejtekbe történő bejuttatásának módszerétől függően, további DNS szekvenciákra lehet szükség. Például, ha a Ti vagy a Ri plazmidot használjuk a növényi sejtek transzformálására legalább a jobb határt, gyakran azonban a Ti és a Ri plazmid T-DNS jobb és bal határát is kapcsolni kell szomszédos régióként a bejuttatandó génekhez.

Ha a transzformációhoz *Agrobacterium*ot használunk, a bejuttatandó DNS-t speciális plazmidokba kell klónozni, vagy egy köztes vektorba, vagy egy bináris



vektorba. A köztes vektorok homológ rekombinációval integrálhatók az *Agrobacterium* Ti vagy Ri plazmidjába azoknak a szekvenciáknak köszönhetően, melyek homológok a T-DNS-ben levő szekvenciákkal. Az említett plazmid tartalmazza a T-DNS transzferálásához szükséges vir régiót. A köztes vektorok nem képesek *Agrobacterium*ban replikálódni. A köztes vektor *Agrobacterium tumefaciens*-be transzferálható egy helper plazmid segítségével (konjugáció). A bináris vektorok mind az *E. coli*-ban mind az *Agrobacterium*okban replikálódhatnak. Ezek tartalmaznak egy szelekciós marker gént és egy kötőt vagy polikötőt, melyeket jobb és bal T-DNS határ régiók határolnak. Ezek közvetlenül transzformálhatók *Agrobacterium*okba (Holster et al., Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187). Az *Agrobacterium*ok transzformálásához használt plazmidok ezenkívül tartalmaznak még egy szelekciós marker gént a transzformált baktérium szelekciójának lehetővé tétele céljából, például az NPTII gént. A gazdasejtként szolgáló *Agrobacterium*nak tartalmaznia kell egy a vir régiót hordozó plazmidot. A vir régió a T-DNS növényi sejtekbe való transzferálásához szükséges. További T-DNS is jelen lehet. Az így transzformált *Agrobacterium*ot növényi sejtek transzformálására használjuk.

A növényi sejtek transzformálására használt T-DNS alkalmazását széleskörűen vizsgálták és kielégítően le is írták: EP 120516, Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci.,4:1-46 és An et al., EMBO J. 4 (1985), 277-287). Néhány bináris vektor már beszerezhető a kereskedelemben is, például a pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc., USA).

A DNS növényi sejtekbe való transzferálásához a növényi explantumokat előnyösen *Agrobacterium tumefaciens*-szel vagy *Agrobacterium rhizogenes*-szel tenyésztjük. A fertőzött növényi anyagból (például levél darabok, törzs szegmentek, gyökerek, valamint protoplasztok, vagy szuszpenzió tenyésztett növényi sejtek is)



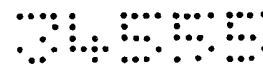
teljes növények regenerálthatók megfelelő tápközegen, mely tartalmazhat antibiotikumokat vagy biocideket a transzformált sejtek szelekciójához. Az így kapott növények a bejuttatott DNS jelenlétére szkrínélhetők.

Ha a bejuttatott DNS egyszer integrálódik a növényi sejt genomjába, általában stabilan ott is marad és megtalálható az eredetileg transzformált sejt utódaiban is. Normális esetben tartalmaz egy szelekciós markert, mely a transzformált sejtnak rezisztenciát biztosít egy biociddal szemben, vagy egy antibiotikummal, például kanamicin, G 418, bleomicin, higromicin, vagy foszfinotricin stb, szemben. A szelektált marker ezért lehetővé kell tegye a transzformált sejt szelekcióját a bejuttatott DNS-t nem tartalmazó sejtekkel szemben.

A transzformált sejtek a sejtek között a szokásos módon fejlődnek (cf. McCormick et al., *Plant Cell Reports* 5 (1986), 81-84). Ezek a növények a hagyományos módon szaporíthatók és keresztezhetők ugyanezen transzformált genetikai anyagot vagy más genetikai anyagot tartalmazó növényekkel. A kapott hibrid egyed a megfelelő fenotípusos tulajdonságokkal rendelkezik.

Két vagy több generációt kell felnevelni ahhoz, hogy biztosítsuk, hogy a fenotípusos tulajdonság stabil és örökölhető. Ezenkívül, magot kell gyűjteni ahhoz, hogy biztosítsuk a megfelelő fenotípust vagy más megtartott tulajdonságot.

Egy a fent leírt folyamatok szerint előállított expressziós kazetta bejuttatása a transzformált növényi sejtekben RNS képződéséhez vezet. Ha egy elágazást megszüntető enzimet kódoló DNS szekvenciát a promóterrel sense orientációban kapcsolunk az expressziós kazettában, mRNS szintetizálódik, mely templátként szolgálhat további vagy új elágazást megszüntető enzimek szintéziséhez a növényi sejtekben. Ennek eredményeként ezek a sejtek fokozott elágazást megszüntető enzim aktivitást mutatnak, ami a sejtekben termelt amilopektin elágazási fokának módosulásához vezet. Ezzel a változással, egy olyan keményítőt nyerünk, mely



felülmúlja a természetesen előforduló keményítőt egy sokkal koordináltabb térbeli szerkezettel és nagyobb egységességgel. Ez többek között előnyös hatással van a keményítő film képző tulajdonságaira.

Ha egy elágazást megszüntető enzimet kódoló DNS szekvenciát antisense orientációban kapcsolunk a promóterrel, egy antisense RNS szintetizálódik a transzgenikus növényi sejtben, mely gátolja az endogén elágazást megszüntető enzim gének expresszióját. Ennek eredményeként, ezek a sejtek csökkent elágazást megszüntető enzim aktivitással rendelkeznek, ami módosított keményítő képződéséhez vezet. Ezt az antisense technikát használva, lehetőség nyílik olyan növények létrehozására, melyekben az endogén elágazást megszüntető enzim géneket 0-100% között különböző mértékben gátolunk, így lehetővé tesszük olyan növények létrehozását, melyek módosított elágazási fokú amilopektin keményítőt szintetizálnak. Ez egy olyan előnyt képvisel a hagyományos termesztéssel és mutagenézises technikákkal szemben, ami jelentős idő és pénz megtakarítást jelent egy ilyen változat létrehozásában. Az erősen elágazó amilopektin különösen nagy felszínnel rendelkezik és így specifikusan alkalmazható kopolimerként. A nagy elágazási fok ezenkívül az amilopektin jobb vízben való oldékonyságát jelenti. Ez a tulajdonság nagyon előnyös bizonyos technikai alkalmazások esetében. Az elágazást megszüntető enzimeket kódoló, a jelen találmány DNS molekuláinak használatával létrehozott módosított amilopektin termeléshez különösen jól használható a burgonya. Azonban, a jelen találmány alkalmazása nem korlátozódik ezen növény használatára.

A transzgenikus növényekben szintetizált módosított keményítő a növényekből vagy növényi sejtekből hagyományos módszereknek megfelelően izolálható és élelmiszeripari és ipari termékek előállítására használható tisztítás után.

Tulajdonságainak köszönhetően, a jelen találmány növényi sejtjeiből és/vagy növényeiből nyerhető keményítő különböző ipari alkalmazásokhoz használható.

Alapjában véve a keményítő két fő kategóriára osztható, nevezetesen a keményítő hidrolízises termékeire és arra, amit natív keményítőnek hívunk. A hidrolízises termékek közé tartoznak lényegében az enzimatis vagy kémiai folyamatokkal nyert glükóz, valamint a glükózt felépítő blokkok, melyek további folyamatokban használhatók, például fermentációban, vagy további kémiai módosításokhoz. Ebben az összefüggésben fontos lehet, hogy a hidrolízises folyamatot egyszerűen és olcsón lehessen elvégezni. Jelenleg, lényegében amiloglükozidázt használva enzimatisan végzik. Megfontolandó, hogy a költségek csökkenthetők, a hidrolízishez szükséges enzimek mennyiségének csökkentésével a keményítő szerkezetének módosítása következtében, például a szemcsék felületének növelése következtében, a jobb emészthetőségnek köszönhetően, kevésbé elágazó vagy térbeli szerkezet következtében, ami a használt enzim hozzáférhetőségét korlátozza.

A natív keményítőnek nevezett rész használata, amit polimer szerkezete következtében alkalmaznak, két nagy területre osztható:

(a) Élelmiszerekben való alkalmazás

A keményítő különböző élelmiszerek klasszikus adalékanyaga, mely élelmiszerekben ez lényegében a vizes adalékok kötőjeként szolgál és/vagy megnövekedett viszkozitást, vagy megnövekedett gélképződést okoz. Fontos jellegzetes tulajdonságok a folyási és szorpciós képesség, a duzzadás és a pasztifikációs hőmérséklet, a viszkozitás és a sűrűsödés, a keményítő oldékonysága, az átlátszóság és a massa állag, a hő, nyírás és sav rezisztencia, a retrogradációs tendencia, filmképzési képesség,

fagyasztással/olvasztással szembeni rezisztencia, emészthetőség, valamint például szervetlen vagy szerves ionokkal való komplex képzési képesség.

(b) Nem élelmiszerekben való alkalmazás

A másik fő alkalmazási terület a keményítő hatásjavítóként való használata különböző termelési folyamatokban és/vagy technikai termékek adalékaként. A keményítő hatásjavítóként való alkalmazásának fő területe először is a papír és karton ipar. Ezen a területen a keményítőt főként retencióként (a szilárd anyagok visszatartásához), a töltő és finom részecskék ízezőjeként, szilárdító anyagként és a dehidrációban használják. Ezenkívül, a keményítő előnyös tulajdonságait - merevség, keménység, szilárdság, tapadás, fényesség, símaság, szakítási erősség, valamint a felületek - hasznosítják.

A papír termelési folyamatban különbséget lehet tenni az alkalmazás négy területe között, nevezetesen felületi kezelés, burkolás, tömeg és "spayezés".

A felületi kezeléssel kapcsolatban a keményítővel szembeni követelmények közé tartoznak lényegében a fényesség magas foka, a megfelelő viszkozitás, a nagy viszkozitási stabilitás, a jó film képzési tulajdonság, valamint a kis porképzés. Ha burkoló anyagként kerül felhasználásra, a szilárd anyag tartalom, a megfelelő viszkozitás, a nagy kötődési képesség és a nagy pigment affinitás a lényeges. A tömeghez való adalékanyagként a gyors, egységes, veszteségmentes diszperzió, az erős mechanikai stabilitás, a teljes retenció a papír pépben a lényeges tulajdonságok. Ha a keményítőt spayezéshez használják a szilárd anyagok megfelelő tartalma, a nagy viszkozitás valamint a nagy kötődési képesség a lényegesek.

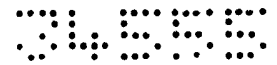
Az alkalmazás egy fő területe például az adhéziós (ragasztó) iparban található, ahol az alkalmazási területeket négy csoportra lehet osztani: a tiszta keményítő ragasztóként, a speciális vegyi anyagokkal készített keményítő

ragasztóként, a keményítő szintetikus gyanták és polimer diszperziók adalékaként, valamint a keményítő szintetikus ragasztók extendereként való használata. Az összes keményítő alapú ragasztó 90%-át a hullámkarton, a papír zacskók, zsákok, a papír és alumínium alkotóanyagaiként, dobozok előállításában és borítékok, bélyegek stb. nedvesedő ragasztójaként használják.

A hatásjavítóként és adalékanyagként való alkalmazás egyéb területe a textilek és a textil kezelési termékek. A textil iparban a következő négy alkalmazási terület különböztethető meg: a keményítő írező anyagként való használata, azaz a bógáncskiválasztó viselkedés simítására és erősítésére szolgáló adalékként a szövés során aktív nyújtó erők elleni védelemhez, valamint az anyag ellenállás növelésére a szövés során, általában minőségromboló előkezelések (például fehérítés, festés, stb) után a textil feljavításához használt anyagként, a festékek anyagának dúsításához használt anyagként a festék diffúzió megakadályozására és a hosszanti szál adalékaként varrófonalaknál.

Ezenkívül a keményítő felhasználható építőipari anyagok adalékaként is. Egy példa a gipszkarton előállítása, ahol a keményítő híg gipszbe keverve vízzel masszává áll, a gipszlemez felszínére diffundál és így a kartont a lemezhez erősíti. A keményítő egyéb alkalmazási területe a gipszhez és ásványi rostokhoz való keverése. A készre kevert cementben a keményítő a megkötési folyamat lassítására használható.

Ezenkívül a keményítő előnyös olyan eszközök előállítására ami a talaj stabilizálását segíti elő, ami a talaj részecskék ideiglenes védelmére szolgál a vízzel szemben a mesterséges föld áthelyezés esetén. A tudomány mai állásánál keményítőt és polimer emulziókat tartalmazó kombinált termékeket



lehet azonos erózió és inkrusztáció csökkentő hatásúnak tartani, mint ezideig használt termékeket, azonban ezek sokkal olcsóbbak.

Ezenkívül a keményítő növényvédőszerekben is használható ezen készítmények specifikus tulajdonságainak módosítása céljából. Például, keményítőket használnak a növényvédő szerek és műtrágyák nedvesedésének javítására, az aktív alkotórészek dozírozott felszabadulására, a folyékony, illó és/vagy szagos aktív alkotórészek mikrokristályokká stabil, deformálható anyagokká való konverziójára, az inkompatibilis készítmények keveréséhez, valamint a csökkent diszintegráció következtében bekövetkező hatás időtartamának meghosszabbítására.

A keményítő másik fontos felhasználási területe a gyógyszerek, a gyógyszeripar és a kozmetikai ipar. A gyógyszeriparban a keményítő tabletták kötőanyagaként használható, vagy a kapszulákban a kötőanyag hígítószerként. Ezenkívül, a keményítő megfelelő diszintegráns a tablettákban, miután lenyelés után folyadékot abszorbeál és rövid idő elteltével megduzzad annyira, hogy az aktív anyag kiszabadul. Az orvosi folyékony anyagok és porok a keményítő alkalmazásának további területei. A kozmetikumok területén a keményítő használható például a por alakú adalékanyagok, mint például illatosítók vagy szalicilsav hordozójaként is. A keményítő alkalmazásának egy viszonylag széles területe a fogkrémek előállítására.

A keményítő szén és brikett adalékaként való használata szintén elképzelhető. A keményítő hozzáadásával, a szén mennyiségileg agglomerálható és/vagy jó minőségben brikettálható, így megakadályozzuk a brikettek idő előtti szétesését. A grillező szén 4-6% hozzáadott keményítőt tartalmaz a "kalorált" (calorated) szén 0,1-0,5% keményítőt tartalmaz. Ezenkívül, a keményítő kötő

anyagként is alkalmazható, miután ha a szénhez és briketthez adják, jelentősen csökkenti a toxikus anyagok emisszióját.

Ezenkívül a keményítő derítő anyagként is használható az érc és szén iszap feldolgozásában.

Az alkalmazás másik területe a feldolgozási anyagok adalékaként való használata az öntés során. A különböző öntési folyamatokhoz kötő anyagokkal kevert homokból készített öntődei magokra van szükség. Manapság, a leggyakrabban használt kötő anyag a módosított keményítővel, leggyakrabban dúzzadó keményítővel kevert bentonit.

A keményítő hozzáadás célja a folyási rezisztencia növelése és a kötési erősség fokozása. Ezenkívül a dúzzadó keményítők a termelési folyamat több előfeltételének megfelelnek, mint például a hideg vízben való diszpergálhatóság, rehidratálhatóság, jó keverhetőség homokkal és jó vízzel való keverhetőség.

A gumiiparban a keményítő a technikai és optikai minőség javítására használható. Ennek oka a javított felületi fényezés, a ragadás és a megjelenés. Ehhez a célhoz a keményítőt gumi anyagok ragadós gumírozott felületein diszpergáljuk a hideg vulkanizálás előtt. A keményítő felhasználható a gumi préselhetőségének javítása céljából is.

A módosított keményítő másik alkalmazási területe a bőr helyettesítő anyagok előállítása.

A műanyag iparban a következő alkalmazási területek merülnek fel: a keményítőtől származó termékek integrációja a feldolgozási folyamatokba (a keményítő csupán egy töltőanyag, nincs közvetlen kötődés a szintetikus polimer és a keményítő között), vagy másik lehetőségként a keményítőtől

származó termékek polimerek előállításához való integrációja (a keményítő és a polimer egy stabil kötést hoz létre).

A keményítő tiszta töltőanyagként való használata nem versenghet más anyagok, például a talkum használatával. Más a helyzet, ha a specifikus keményítő tulajdonságok hatékonyakká válnak és a végtermék tulajdonság profilja így egyértelműen megváltozik. Egy példa a keményítő termékek termoplasztikus anyagok, például a polietilén feldolgozásában való használata. Így a keményítőt és a szintetikus polimert 1:1 arányban keverjük koexpresszió segítségével egy "master batch" létrehozása céljából, amiből különböző termékeket lehet létrehozni, általános technikák segítségével, granulált polietilént használva. A keményítő polietilén filmekben való integrálása fokozott anyag permeabilitást okozhat az üreges testekben, fokozott víz pára permeabilitást, fokozott antistatikus viselkedést, fokozott anti-blokkoló viselkedést, valamint fokozott vizes festékekkel való nyomhatóságot.

Másik lehetőség a keményítő poliuretán habokban való használata. A keményítő származékok adaptációjának köszönhetően, valamint a feldolgozási technikák optimalizációjának köszönhetően lehetőség van a szintetikus polimerek és a keményítő hidroxil csoportjai közötti reakciók specifikus szabályozására. Az eredmény olyan poliuretán film, mely a következő tulajdonság profillal rendelkezik a keményítő használatának köszönhetően: a hő expanzió csökkent koeficiense, csökkent zsugorodási viselkedés, javított nyomás/nyúlási viselkedés, fokozott vízgőz permeabilitás a víz befogadási képesség változása nélkül, csökkent gyúlékonyság és repedési sűrűség, az éghető részek nem csökkennek, nincsenek halogenidek, és

csökkent az öregedés. A még meglévő hátrányok a csökkent nyomási és ütközési erősség.

A filmek termék fejlesztése nem az egyetlen lehetőség. A szilárd műanyag termékek, mint például az edények, tálcák, tálak előállíthatók az 50%-nál nagyobb keményítő tartalom segítségével. Ezenkívül, a keményítő/polimer keverékek azzal az előnnyel rendelkeznek, hogy biológiai úton sokkal könnyebben lebomlanak.

Ezenkívül, kiemelkedő vízkötő képességüknek köszönhetően, a keményítővel oltott polimerek kiemelkedő jelentőségűvé váltak. Ezek olyan termékek, melyek egy keményítő gerinccel rendelkeznek és a szintetikus monomer oldal rácsa van ráoltva a gyökös lánc mechanizmusok elméletének megfelelően. A jelenleg beszerezhető keményítővel oltott polimerek a következőkkel jellemezhetők: fokozott kötődéssel, 1000 g víz/g keményítő visszatartó képességgel nagy viszkozitásnál. Ezen szuper abszorbeálók alkalmazási területe kibővült az utóbbi néhány évben és ezek főként a higénia területén kerültek felhasználásra, például olyan termékek esetében, mint a pelenkák és lepedők, valamint a mezőgazdasági szektorban, például mag pelletekként.

A génszintetileg módosított új keményítő használatához döntő fontosságú, a szerkezet, a víztartalom, a protein tartalom, a lipid tartalom, a rost tartalom, a hamu/foszfát tartalom, az amilóz/amilopektin arány, a relatív mól tömeg megoszlása, az elágazás foka, a szemcse mérete és formája, valamint a kristályosodás, másrészt pedig a következő jellemzőkből eredő tulajdonságok: folyási és szorpciós viselkedés, a pasztifikációs hőmérséklet, a sűrűsödési képesség, az oldékonyság, a massa szerkezet, az átlátszóság, a hő, nyírás és sav rezisztencia, a retrogradációra való hajlam, a gélképzési képesség, a fagyasz-tással/olvasztással szembeni rezisztencia,

komplex képzési képesség, jód kötés, film képzés, adhézios erősség, enzim stabilitás, emészthetőség és reaktivitás. Ezenkívül, a viszkozitás különösen fontos.

Ezenkívül, a jelen találmány növényi sejtjeiből és/vagy növényeiből nyerhető módosított keményítő további kémiai módosításnak vethető alá, ami a fent leírt alkalmazási területekhez vagy új alkalmazási területekhez lényeges minőség javulást eredményezhet. Ezek a kémiai módosítások elméletileg ismertek a tudomány e területén képzett szakember számára. Ezek különösen az alábbiak segítségével végrehajtott módosítások:

- savas kezelés
- oxidáció
- észterifikáció (foszfát, nitrát, szulfát, xantát, acetát és citrát keményítő létrehozása, más szerves savak szintén felhasználhatók az észterifikációhoz)
- keményítő éterek létrehozása (keményítő alkil éter, o-allil éter, hidroxialkil éter, o-karboximetil éter, N-tartalmú keményítő éterek, S-tartalmú keményítő éterek létrehozása)
- elágazó keményítő létrehozása
- keményítővel oltott polimer létrehozása.

A jelen találmány ezenkívül a jelen találmány DNS molekuláival is kapcsolatos, melyeket a vad típusú növényekhez képest módosított elágazási fokú amilopektin keményítőt szintetizáló növények termelésére használunk.

A jelen találmány egy további célja a találmány DNS molekuláinak, vagy ezen DNS molekulák részeinek, vagy ezen molekulák reverz komplementjeinek használata egy elágazást megszüntető enzim enzimatikus aktivitásával rendelkező proteinek, vagy ilyen proteinek fragmentjét kódoló homológ molekulák növényekből vagy más organizmusokból való azonosítására vagy izolálására. A "homológia" kifejezés meghatározását korábban megadtuk.

Az 1. ábra a pDBE-Spi plazmidot mutatja

A vékony vonal a pBluescriptSKII(-) plazmid szekvenciájának felel meg. A vastag vonal a *Spinacia oleracea* elágazást megszüntető enzimjét kódoló cDNS-t képviseli. A cDNS inzertet a plazmid polikötőjének EcoRI és XhoI restriktációs helyei közé ligáltuk. A nyíl az elágazást megszüntető enzim kódoló régiójának orientációját jelzi. A cDNS inzert DNS szekvenciáját a 17. számú szekvenciában mutatjuk be.

A 2. ábra a p35S-DBE-Spi plazmidot mutatja

A = A fragment: CaMV 35S promóter, 6909-7437 nukleotid

(Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294)

B = B fragment: a *Spinacia oleracea*-ból származó, elágazást megszüntető enzimet kódoló cDNS;

a pDBE-Spi plazmidból származó EcoRI/XhoI fragment, körülbelül 3440 bp;

a promóterhez viszonyított orientációja: sense

C = C fragment: a pTiACH5 Ti plazmid T-DNS-ének 11748-11939 nukleotidjai

(Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846)

A 3. ábra a *Solanum tuberosum*-ból származó elágazást megszüntető enzim tisztítását mutatja

O = a *Solanum tuberosum* gumó szövetének homogenizátumából származó protein kivonat

Durchlauf = a protein kivonat affinitás kromatográfiájának kitöltetlen térfogata immobilizált béta-ciklodextrinen

béta-ciklodextrin = az affinitás kromatográfia elúciója oldott béta-ciklodextrinnel 1 mg/ml vagy 10 mg/ml koncentrációban

DBE = *Solanum tuberosum*-ból származó elágazást megszüntető enzim

DE = *Solanum tuberosum*-ból származó aránytalanító enzim

A 4. ábra a pDBE-Pot plazmidot mutatja

A vékony vonal a pBluescriptSKII(-) plazmid szekvenciájának felel meg. A vastag vonal a *Solanum tuberosum* elágazást megszüntető enzim egy részét kódoló cDNS-t képviseli. A nyíl az elágazást megszüntető enzim kódoló régiójának orientációját jelzi. A cDNS inzertet a plazmid polikötőjének BamHI és SmaI restriktions helyei közé ligáltuk. A cDNS inzert DNS szekvenciáját a 23. számú szekvenciában mutatjuk be.

Az 5. ábra a p35S-antiDBE-Pot plazmidot mutatja

A = A fragment: CaMV 35S promóter, 6909-7437 nukleotid

(Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294)

B = B fragment: a *Solanum tuberosum*-ból származó, elágazást megszüntető enzim egy részét kódoló részleges cDNS szekvencia;

a pDBE-Pot plazmidból származó SmaI/BamHI fragment, körülbelül 500 bp;

a promóterhez viszonyított orientációja: anti-sense

C = C fragment: a pTiACH5 Ti plazmid T-DNS-ének 11748-11939 nukleotidjai

(Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846)

A 6. ábra egy a p35S-DBE-Spi plazmiddal transzformált és a vad típusú burgonya

(RE7 sorozat) gumó kivonatból származó elágazást megszüntető enzimre vonatkozó aktivitási gélt mutat.

DBE = elágazást megszüntető enzim

W = vad típusú növény

A számok a vizsgált növény vonalak számát jelzik.

A 7. ábra egy Rapid Visco Analyser által rögzített, burgonyából izolált keményítő

vizes oldatainak görbét mutatja. Az 1-3 görbék a p35S-DBE-Spi plazmiddal transzformált burgonyából nyert keményítő oldatainak viszkozitását jelzi.

Összehasonlítás céljából a 4-es görbe a vad típusú keményítő viszkozitási profilját mutatja.

1-es görbe: RE7-34 növény vonal

2-es görbe: RE7-26 növény vonal

3-as görbe: RE7-10 növény vonal

4-es görbe: vad típusú keményítő

A 8. ábra a létrehozott keményítő gélek stabilitását mutatja. A görbék a gél deformálásához szükséges erőt illusztrálják. Az 1-3 erő profilok a p35S-DBE-Spi plazmával transzformált burgonyából nyert keményítőnek felelnek meg. Összehasonlításként, a 4-es görbe a vad típusú keményítő erő profilját mutatja:

1-es görbe: RE7-34 növény vonal

2-es görbe: RE7-26 növény vonal

3-as görbe: RE7-10 növény vonal

4-es görbe: vad típusú keményítő

A 9. ábra egy a p35S-antiDBE-Pot plazmával transzformált és a vad típusú burgonya (RE500 sorozat) gumó kivonatból származó elágazást megszüntető enzimre vonatkozó aktivitási gélt mutat.

DBE = elágazást megszüntető enzim

W = vad típusú növény

A számok a vizsgált növény vonalak számát jelzik.

A 10. ábra a p35S-antiDBE-Pot plazmával transzformált burgonyából származó keményítő szemcse mikroszkópikus fényképét mutatja.

A 11. ábra egy Rapid Visco Analyser által rögzített, burgonyából izolált keményítő vizes oldatainak görbéjét mutatja. Az 1-3 görbék a p35S-antiDBE-Pot plazmával transzformált burgonyából nyert keményítő oldatainak

viszkozitását jelzik. Összehasonlítás céljából a 4-es görbe a vad típusú keményítő viszkozitási profilját mutatja.

1-es görbe: RE500-47 növény vonal

2-es görbe: RE500-75 növény vonal

3-as görbe: RE500-81 növény vonal

4-es görbe: vad típusú keményítő

A 12. ábra a létrehozott keményítő gélek stabilitását mutatja. A görbék a gél deformálásához szükséges erőt illusztrálják. Az 1-3 erő profilok a p35S-antiDBE-Pot plazmida transzformált burgonyából nyert keményítőnek felelnek meg. Összehasonlításként, a 4-es görbe a vad típusú keményítő erő profilját mutatja:

1-es görbe: RE500-47 növény vonal

2-es görbe: RE500-75 növény vonal

3-as görbe: RE500-81 növény vonal

4-es görbe: vad típusú keményítő

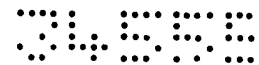
A példák a jelen találmány illusztrálására szolgálnak.

A következő példákban a következő technikákat használjuk:

1. Klónozási technika

Az *E. coli*-ban való klónozáshoz a pBluescriptSKII(-) (Stratagene) és a pUC19 plazmidokat használjuk.

A növény transzformáláshoz a gén szerkezeteket a pBinAR vektorba klónozzuk.



2. Baktérium törzsek

A pBluescript vektorokhoz a pUC vektorokhoz és a pBinAR szerkezetekhez az *E. coli* DH5alfa törzset (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) használjuk. Az in vivo kimetszéshez az *E. coli* XL1-Blu törzset használjuk.

A plazmidok burgonyaába való transzformálásához az *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 pGV2260 törzset (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777-4788) használjuk.

3. Az *Agrobacterium tumefaciens* transzformálása

A DNS transzferálását Höfgen és Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877) módszerét használva közvetlen transzformációval hajtjuk végre. A transzformált *Agrobacterium*ok plazmid DNS-ét Birnboim és Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) módszerének megfelelően izoláljuk, majd gélelektroforézises analízisnek vetjük alá a megfelelő restrikció után.

4. Burgonya transzformációja

Burgonya (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) steril tenyészet kis leveleit egy szikével megsértjük és 10 ml MS tápközegbe (Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15 (1962), 473) helyezzük, mely 2 % szacharózt és 50 µl szelektíven szaporított *Agrobacterium tumefaciens* egy éjszakás tenyészetét tartalmazza. Miután a keveréket óvatosan összerázzuk 3-5 percig, tovább inkubáljuk sötétben 2 napig. A kallusz indukcióhoz a leveleket 1,6% glükózt, 5 mg/l naftil ecetsavat, 0,2 mg/l benzil aminopurint, 250 mg/l claforant, 50 mg/l kanamicint és 0,80% Bacto agart tartalmazó MS tápközegre helyezzük. 25 C° hőmérsékleten, 3000 lux mellett tartó 1 hetes inkubálás után a leveleket hajtás indukció céljából 1,6% glükózt, 1,4 mg/l zeatin ribózt, 20 mg/l naftil ecetsavat, 20 mg/l giberellinsavat, 250 mg/l claforant, 50 mg/l kanamicint és 0,80% Bacto agart tartalmazó MS agarra helyezzük.



5. A DNS fragmentek radioaktív jelölése

A DNS fragmenteket radioaktív jelöléssel látjuk el a Boehringer (Germany) egy DNS Random Primer Labelling Kit-jét használva a gyártók útmutatásának megfelelően.

6. Northern lenyomat analízis

Standardt technikákat használva RNS-t izolálunk növények levél szövetéből. Agaróz gélen (1,5 % agaróz, 1 x MEN puffer, 16,6 % formaldehid) 50 µg RNS-t szeparálunk. A gél rövid ideig vízzel mossuk a gél futtatása után. Az RNS-t 20 x SSC-vel transzferáljuk kapilláris lenyomatolással egy Hybond N nylon membránra (Amersham, UK). Ezután az RNS-t a membránra UV kereszt kötéssel rögzítjük.

A membránt előhibridizáljuk NSEB pufferben 68 C° hőmérsékleten 2 órán keresztül, majd NSEB pufferben hibridizáljuk 68 C° hőmérsékleten egy éjszakán keresztül a radioaktív jelölésű próba jelenlétében.

7. A növény termesztése

A burgonya növényeket üvegházban tenyésztjük a következő körülmények között:

Fény periódus: 16 óra, 25000 lux, 22 C° hőmérséklet

Sötét periódus: 8 óra, 15 C° hőmérséklet

Nedvességtartalom: 60%

8. Az elágazást megszüntető enzim natív gélben való detektálása

Az elágazást megszüntető enzim aktivitás nem-denaturáló gél elektroforézis segítségével történő detektálásához burgonya gumó szövet mintákat tárunk fel 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 2 mM DTT, 2,5 mM EDTA, 10% glicerol és 0,4 mM PMSF elegyében. Az elektroforézist egy MiniProtean II kamrában végezzük el (BioRad) nem denaturáló körülmények között Laemmli módszerének (Nature 227 (1970), 680-685) megfelelően. A 1,5 mm vastag gélek monomer koncentrációja 7,5% (w/v) és a

gél 1 % vörös pullulant (Megazyme, Australia) tartalmaz. Protein kivonat azonos mennyiségeit helyezük fel és szeparáljuk 2 órán keresztül 10 mA/gél értéken.

Ezután az aktivitás géleket 100 mM nátrium acetát (pH 6,0) és 0,1% béta-merkaptóetanol elegyében inkubáljuk 37 C° hőmérsékleten. Az elágazást megszüntető enzim aktivitást a vörös pullulan hidrolízisén keresztül (elszínítenedés) detektáljuk.

9. Keményítő analízis

A transzgenikus burgonya növények által termelt keményítőt a következő módszerekkel jellemezzük:

a) A foszfát tartalom meghatározása

A burgonya keményítőben némely glükóz egység a C3-as és a C6-os pozícióknál levő szénatomoknál foszforilálható. A glükóz C6 pozíciójánál levő foszforiláltság fokának meghatározásához 100 mg keményítőt hidrolizálunk 1 ml 0,7 M HCl-ben 95 C° hőmérsékleten 4 órán keresztül (Nielsen et al., Plant Physiol. 105 (1994), 111-117). 0,7 M KOH-val történő semlegesítés után 50 µl hidrolizátumot vetünk alá fotometriás-enzimatikus tesztnek a glükóz-6-foszfát tartalom meghatározása céljából. A teszt keverék (100 mM imidazol/HCl, 10 mM MgCl₂; 0,4 mM NAD; 2 egység glükóz-6-foszfát dehidrogenáz a *Leuconostoc mesenteroides*-ből; 30 C° hőmérséklet) abszorpciós változását 334 nm hullámhosszon mérjük.

b) A burgonya növényekből származó amilóz/amilopektin arány meghatározása

A burgonyából a keményítőt standard technikáknak megfelelően határozzuk meg és az amilóz/amilopektin arányt a Hovenkamp-Hermelink et al (Potato Res. 31 (1988), 241-246) által leírt módszernek megfelelően határozzuk meg.

c) A keményítő vizes oldata viszkozitásának meghatározása

A transzformált burgonya növények által szintetizált keményítő vizes oldata viszkozitásának meghatározása céljából keményítőt izolálunk transzformált növények gumójából. 2 g keményítőt oldunk fel 25 ml H₂O-ban és ezt használjuk a Rapid Visco Analyser készülékben (Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australia) való analízishez. Az analizátort a gyártók útmutatásának megfelelően működtetjük. A keményítő vizes oldata viszkozitásának meghatározásához a keményítő szuszpenziót először 50 C° hőmérsékletre 96 C° hőmérsékletre melegítjük 12 C°/perc sebességgel. Ezt követően, a hőmérsékletet 96 C°-on tartjuk 2,5 percig. Ezután az oldatot 96 C° hőmérsékletre 50 C° hőmérsékletre hűtjük 16,4 C°/perc sebességgel. A teszt teljes ideje alatt mérjük a viszkozitást. Ezen mérések megfelelő eredményeit görbéként ábrázoljuk, mely az idő függvényében ábrázolja a viszkozitást.

d) A gél stabilitásának meghatározása

A keményítő további jellemzéséhez gél stabilitását mérjük egy TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro System, Unit 105, Blackdown Rural Industries, Haste Hill, Haslemere, Surrey GU 27 3AY, England) készüléket használva a gyártók útmutatásának megfelelően. A Rapid Visco Analyser (lásd a 9c pontot) készülékből nyert masszát szobahőmérsékleten tároljuk 24 órán keresztül a gél képződés lehetővé tétele céljából. Ezután a gél stabilitást úgy mérjük, hogy egy műanyag próbát (d=10 mm) hagyunk penetrálni a 2 cm vastag gél mintán 0,5 mm/sec sebességgel 7 mm mélységig. A mérés jellegzetes erő profilt eredményez az idő függvényében.

A használt rövidítések

EDTA	etilén diamin tetraecetsav
IPTG	izopropil béta-D-tiogalakto-piranozid
PAAG	poliakrilamid gél
PCR	polimeráz lánc reakció
PMSF	fenil-metil-szulfonil fluorid
SDS	nátrium dodecil szulfát

Felhasznált anyagok és oldatok

A puffer	50 mM nátrium acetát (pH 6,0) 2,5 mM 1,4-ditio-DL-treitol 1,5 mM béta-merkaptóetanol 0,4 mM PMSF nátrium biszulfít, nátrium szulfít és aszorbinsav nyomnyi mennyisége
B puffer	50 mM MES pH 5,8 NaOH-val
C puffer	250 mM foszfát puffer 250 mM NaCl 1 mM EDTA 7% SDS 25% PEG6000 25% formamid 250 mg/l denaturált hering sperma DNS

H puffer	2 x SSC
	10 x Denhardt-féle oldat
	0,1% SDS
	5 mM EDTA
	50 mM dinátrium foszfát
	250 mg/ml hering sperma DNS
	50 mg/ml tRNS
20 x SSC	175,3 g NaCl
	88,2 g nátrium citrát
	1000 ml-re igazítjuk ddH ₂ O-val
	pH 7,0 10 N NaOH-val

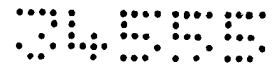
1. példa

Egy elágazást megszüntető enzim *Spinacia oleracea*-ból való tisztítása és a peptid szekvencia meghatározása

A spenótból származó elágazást megszüntető enzim tisztításához 500 g "középső erétől megfosztott" spenót levelet homogenizálunk 1,5 l B pufferben "homogenizátorban" 1 percen keresztül. A homogenizátumot egy 6 rétegű muszlin ruha szendvicsen átszűrjük. Ha szükséges, a pH értéket 5,8-ra igazítjuk. A homogenizátumot 25000 x g értéken centrifugáljuk 30 percen keresztül. Ezután a proteineket a felülúszóból kicsapatjuk ammónium szulfátos kicsapatással 0 C° hőmérsékleten. Ebből a célból, az ammónium szulfátot folyamatosan adjuk hozzá keverés mellett a felülúszóhoz a telítődési koncentráció 40 %-os koncentrációjának eléréséig. A proteinek kicsapatását keverés mellett további 30 percig folytatjuk. A kicsapatott proteinek centrifugálással (25000 x g, 30 perc) való szeparációja után a kapott felülúszót ammónium szulfáttal keverjük a telítődési koncentráció 50%-os

koncentrációjának eléréséig. A kicsapatást újabb 30 percig folytatjuk. Ezután a keveréket 25000 x g értéken 30 percig centrifugáljuk és a kicsapatott proteineket körülbelül 80 ml B pufferben reszuszpendáljuk. 30000 x g értéken 15 percig tartó centrifugálás után a felülúszót eltávolítjuk és egy B pufferrel ekvibrált affinitási oszlopra helyezzük. Az affinitási oszlop anyaga epoxy-aktivált szefaróz 6B (Sigma), melyhez béta-ciklodextrint (Ciklo-hepta-amilóz; Sigma) kapcsolunk a Ludwig et al (Plant Physiol. 74 (1984), 856-861) által leírtaknak megfelelően. Az affinitási oszlopot B pufferrel mossuk, míg az elúátum semmilyen abszorpciót nem mutat 280 nm hullámhosszon. Az elágazást megszüntető enzim elúcióját 1 mg/ml béta-ciklodextrinnel végezzük el B pufferben. A frakciókat DNSS tesztel vizsgáljuk az elágazást megszüntető enzim aktivitásra (lásd Ludwig et al., loc. cit.) és összegyűjtjük. A ciklodextrin eltávolítását és a protein oldat koncentrációját Centricon 30 kémcsövekkel (Amicon) hajtjuk végre B pufferrel való többszörös mosással.

A tisztított protein 200 µg mennyiségét BrCN-nel hasítjuk a Matsudaira ("A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing", Academic Press, Inc., San Diego (1989), p.29) által leírtak szerint. A kapott peptideket SDS poliakrilamid gél elektroforézissel szeparáljuk. A használt gél egy grádiens gél, melyben a poliakrilamid koncentráció 12%-ról 18%-ra nő, állandó, 6 M karbamid koncentráció mellett. A peptideket az SDS gélről egy PVDF membránra visszük fél-száraz-elektrolenyomatolással. Az izolált peptidek peptid szekvenciáját standard technikáknak megfelelően határozzuk meg. A *Spinacia oleracea* elágazást megszüntető enzimjéből azonosított peptid szekvenciák közül kettő a 13. és a 14. számú szekvenciákban került leírásra.



2. példa

Egy spenótból származó elágazást megszüntető enzim kódoló cDNS izolálása

Az 1. példa szerint nyert spenótból származó elágazást megszüntető enzim peptid szekvenciáját azon oligonukleotid szekvenciák származtatására használjuk, melyek a spenótból származó elágazást megszüntető enzim kódoló gén DNS szekvenciájának régióit képviselik, ha figyelembe vesszük a genetikai kód degeneráltságát. A származtatott oligonukleotid szekvenciákkal összhangban szintetikus oligonukleotidokat szintetizálunk standard technikák szerint. Ezeket az oligonukleotidokat használjuk a PCR technikával történő amplifikációhoz spenót levelekből származó mRNS-t használva templátként.

Az oligonukleotidok lehető leghatékonyabb kívánt DNS fragmenthez való hibridizációjához a lehető leghosszabb oligonukleotidokat kell használni. Azonban a növekvő hosszúsággal a degeneráltság mértéke is nő, azaz nő a különböző szekvencia kombinációjú oligonukleotidok száma. A 6000-ig terjedő degeneráltsági fok még elfogadható.

A 13. számú szekvenciában leírt peptid szekvenciához a szekvenciát egy 20 bp hosszúságú oligonukleotid próbához származtatjuk. Az oligonukleotid GC tartalma maximálisan 40% és minimálisan 30%. A 14. számú szekvenciában leírt peptid szekvenciához a szekvenciát egy 20 bp hosszúságú oligonukleotid próbához származtatjuk. Az oligonukleotid GC tartalma maximálisan 45% és minimálisan 35%.

Az oligonukleotidok szintéziséhez való szekvencia templátok a következők:

A peptid: NH₂-Gln Pro Ile Glu Thr Ile Asn Tyr Val-COOH

(13. számú szekvencia)

RNS: 5' CAR CCN AUH GAR ACN AUH AAY UAY GUN 3'

A oligo: 3' TAC GTY GGW TAR CTY TGW TA 5'

(15. számú szekvencia)



B peptid: NH₂-Asn Ile Asp Gly Val Glu Gly-COOH

(14. számú szekvencia)

mRNS: 5' AAY AUH GAY GGN GUN GAR GGN 3'

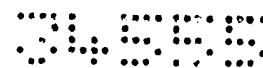
B oligo 5' AAY ATY GAT GGW GTU GAR GG 3'

(16. számú szekvencia)

Az RNS-t sponót levelekből izoláljuk standard technikáknak megfelelően. Ezt használjuk PCR-hoz az A és B oligonukleotidokat használva. Az egyes oligonukleotidok 100 pmol mennyiségeit használjuk reakció keverékneként 52 C° hőmérsékletű anneálási hőmérsékleten és 1,5 mM MgCl₂ koncentráció mellett. 30 ciklust hajtunk végre. A PCR körülbelül 500 bp hosszúságú DNS fragmentet eredményez.

Ezt a DNS fragmentet a pUC19 vektorba ligáljuk, melyet a SmaI-gyel hasítottuk. A kapott plazmid a pAR1 plazmid. A DNS inzert szekvenciájának egy részét Sanger et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977), 5463-5467) módszerét használva határozzuk meg. A meghatározott szekvencia a 17. számú szekvenciában megadott DNS szekvencia 1920-2216 nukleotidjainak felel meg, a degenerált oligonukleotidokkal bejuttatott hibás párosodások kivételével. Az említett szekvenciából származó aminosav szekvencia 42,2% azonosságot mutat a *Klebsiella aerogenes*-ből származó pulA génnel, mely a pullulanázt kódolja, egy 90 aminosavból álló szakaszon túl.

A sponótból származó elágazást megszüntető enzimet kódoló cDNS molekulák izolálásához egy cDNS könyvtárat szerkesztünk meg a Lambda ZAP II (Stratagene) vektorban Sonnewald et al., (Planta 189 (1993), 174-181) leírásának megfelelően és a fág fejekbe csomagoljuk. Ezt követően, az XL1-Blue törzs *E. coli* sejtjeit fertőzzük a cDNS fragmenteket tartalmazó fágokkal és Petri csészékben egy



táptalajra szélesztjük körülbelül $30000/75 \text{ cm}^2$ sűrűségben. Körülbelül 8 órás inkubálás után nitrocellulóz membránokat helyezünk a lizált baktérium rétegre és egy perc elteltével eltávolítjuk. A szűrőt 2 percig 0,2 M NaOH, 1,5 M NaCl elegyében inkubáljuk, majd 2 percig 0,4 M Tris/HCl-ben (pH 7,5) és végül 2 percig 2 x SSC-ben. A szűrőket megszáritjuk UV kereszt kötjük és 42 C° hőmérsékleten 3 órán keresztül inkubáljuk C pufferben a radioaktív jelölésű próba hozzáadása előtt. Próbaként a pAR1 plazmid cDNS inzertjét használjuk. A hibridizációt 42 C° hőmérsékleten hajtjuk végre 12 - 16 óra alatt. Ezután a szűrőket 45 C° hőmérsékleten mossuk 15 percig 1 x SSC/0,3% SDS-ben, majd háromszor 15 percig 0,1 x SSC/0,3% SDS-ben, majd autoradiográfiának vetjük alá.

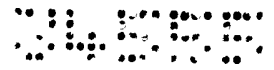
A pozitív fág klónokat egyediesítjük és standard technikákat használva tovább tisztítjuk. Az *in vivo* kimetszési módszert használjuk a pozitív fág klónokból a megfelelő cDNS inzertet tartalmazó kétszálú pBluescript plazmidot tartalmazó *E. coli* klónok nyerésére. Az inzertek méret és restrikcións mintázatának vizsgálata után a megfelelő klónok DNS szekvenciáját meghatározzuk. Több olyan klónt azonosítunk, melyek a spenótból származó elágazást megszüntető enzimet kódoló inzerteket tartalmaznak, különösen a 17. számú szekvenciában leírt DNS szekvencia 1804-3067 nukleotidjait magába foglaló cDNS inzerttel rendelkező klónt. Azonban teljes klónokat nem nyerünk.

Az elágazást megszüntető enzimet kódoló teljes régiót tartalmazó cDNS molekulák izolálásához spenót levélből származó mRNS-sel rendelkező specifikus cDNS könyvtárat hozunk létre. Ebből a célból, spenót levelekből származó teljes RNS-t izolálunk standard technikáknak megfelelően. A poli(A⁺) mRNS kinyeréséhez a teljes RNS-t helyezzük egy poli(dT) oszlopra, melyről a poli(A⁺) mRNS-t eluáljuk.

A poli(A⁺) mRNS-ből kiindulva cDNS-t hozunk létre Gubler és Hoffmann (Gene 25 (1983), 263-269) módszerének megfelelően egy XhoI oligo d(t)₁₈ primert

használva. A cDNS-t XhoI-gyel hasítjuk az EcoRI kötő hozzáadása után és irányított módon egy Lambda Uni-ZAP XR vektorba (Stratagene) ligáljuk, mely vektort EcoRI-gyel és XhoI-gyel hasítottunk. Körülbelül 2000000 így létrehozott cDNS könyvtár plakkot szkrínelünk az elágazást megszüntető enzimet kódoló cDNS szekvenciákra. Ebből a célból az XL1-Blue törzs *E. coli* sejtjeit a cDNS fragmenteket tartalmazó fágokkal fertőzzük és Petri csészékben tápközegre szélesztjük körülbelül 30000/75 cm² sűrűségben. Körülbelül 8 órás inkubálás után nitrocellulóz membránokat helyezünk a lizált baktérium rétegre, majd 1 perc múlva eltávolítjuk. A szűrőket 2 percig 0,2 M NaOH, 1,5 M NaCl elegyében inkubáljuk, majd 2 percig 0,4 M Tris/HCl-ben (pH 7,5), majd ezt követően 2 percig 2 x SSC-ben. A szűrőket megszáritjuk UV kereszt kötjük és 42 C° hőmérsékleten 3 órán keresztül inkubáljuk C pufferben a radioaktív jelölésű próba hozzáadása előtt. Próbaként vagy az elágazást megszüntető enzimet kódoló régió csupán részeit tartalmazó fent leírt cDNS inzerteket használjuk, vagy a pAR1 plazmid inzertjét. A 42 C° hőmérsékleten 12 órán át tartó hibridizáció után a szűrőket 45 C° hőmérsékleten mossuk 15 percig 1 x SSC/0,3% SDS-ben majd háromszor 15 percig 0,1 x SSC/0,3% SDS-ben, majd autoradiográfiát végzünk.

A pozitív fág klónokat egyediesítjük és standard technikákat használva tovább tisztítjuk. Az in vivo kimetszési módszert használjuk a pozitív fág klónokból a megfelelő cDNS inzertet tartalmazó kétszálú pBluescript plazmidot tartalmazó *E. coli* klónok nyelésére. Az inzertek méret és restriktós mintázatának vizsgálata után a megfelelő klónok DNS szekvenciáját izoláljuk és a cDNS inzert DNS szekvenciáját meghatározzuk.



3. példa

A pDBE-Spi plazmid cDNS inzertjének szekvencia analízise

A 2. példa szerint nyert *E. coli* klónból a pDBE-Spi plazmidot izoláljuk (1. ábra) és cDNS inzertjét standard technikáknak megfelelően meghatározzuk a didezoxi módszert használva (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977), 5463-5467). Az inzert hosszúsága körülbelül 3437 bp. A nukleotid szekvenciát és a származtatott aminosav szekvenciát a 17. számú szekvenciában mutatjuk be.

4. példa

A p35S-DBE-Spi plazmid megszerkesztése, burgonya növények transzformációja, valamint a szintetizált keményítő jellemzése

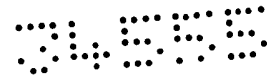
A pDBE-Spi plazmidból egy körülbelül 3450 bp hosszúságú DNS fragmentet nyerünk EcoRI/XhoI restrikciós endonukleázzal való emésztéssel, ami a 17. számú szekvenciában bemutatott szekvenciával rendelkezik és a spenót elágazást megszüntető enzim kódoló régióját tartalmazza. Ezt a DNS fragmentet klónozzuk a pBinAR vektorba (Höfgen and Willmitzer Plant Sci. 66 (1990), 221-230), melyet Smal-lyel hasítottunk. A pBinAR vektor a pBin19 bináris vektor (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8721) származéka.

A pBinAR plazmid megszerkesztését a 12. példában írjuk le.

A kapott plazmidot p35S-DBE-Spi plazmidnak nevezzük és a 2. ábrán írjuk le.

A cDNS fragment inzertálása egy olyan expressziós kazettát eredményez, mely az alábbiak (2. ábra) szerinti A, B és C fragmenteket tartalmazza:

Az A fragment (529 bp) a karfiol mozaik vírus (CaMV) 35S promóterét tartalmazza. A fragment magába foglalja a CaMV 6909-7437 nukleotidjait (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294).



A B fragment a proteint kódoló régiót tartalmazza, valamint a spenót elágazást megszüntető enzimét kódoló cDNS szomszédos régióit. Ezt egy EcoRI/XhoI fragmentként izoláljuk a pDBE-Spi plazmidból a fent leírtak szerint és a pBinAR plazmidban levő promóterhez sense orientációban fúzionáltatjuk.

A C fragment (192 bp) a pTiACH5 Ti plazmid T-DNS-e 3-as génjének poliadenilációs jelét tartalmazza (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846).

A p35S-DBE-Spi plazmid mérete körülbelül 14,2 kb.

A p35S-DBE-Spi vektort burgonya növényi sejtekbe transzferáljuk *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformációval. A transzformált sejtekből intakt növényeket regeneráltatunk.

A spenót elágazást megszüntető enzimjét kódoló mRNS jelenlétének meghatározására szolgáló RNS analízist a sikeresen végrehajtott genetikai módosítás értékelésére lehet használni. Ebből a célból, általában northern lenyomat analízist hajtunk végre. Teljes RNS-t izolálunk növényi szövetből a Logemann et al által leírt (Anal. Biochem. 163 (1987), 16-20) módszernek megfelelően, gél elektroforézissel szeeparáljuk, egy nylon membránra transzferáljuk és egy megfelelő próbához hibridizáltatjuk.

A transzformáció eredményeként a transzgenikus burgonya növények fokozott elágazást megszüntető enzim aktivitást mutatnak (cf 6. ábra).

Az ezen növények által termelt keményítőt ezt követően analizáljuk és jellemezzük. A transzgenikus növények által termelt keményítő viszkozitását és gél stabilitását tekintve különbözik a vad típusú növények által szintetizált keményítőtől.

A viszkozitást egy Rapid Visco Analyser készülékkel határozzuk meg a fent leírt módszernek megfelelően. Az eredményeket a 7. ábrán mutatjuk be. A 7. ábra a 4-es görbén egy tipikus RVA görbét mutat a Désirée változatú burgonya vad típusából izolált keményítő esetében. A transzformált növény vonalak 1-3 görbéi

sokkal kisebb - teljesen viszkozitási maximum mentes állapotot mutat a 96 C° hőmérsékletre való melegítés után, valamint magasabb növekedést az 50 C° hőmérsékletre való hűtés után. A transzgenikus p35S-DBE-Spi növényekből származó keményítő maximális viszkozitása lényegesen csökken a vad típusú növényekből származó keményítőhöz képest. A módosított keményítő végső viszkozitása az ezt követő hűtés után lényegesen magasabb, mint a vad típusú növényekben szintetizált keményítő értékei.

A 8. ábra a transzgenikus növény vonalak keményítőjéből készített gél gél stabilitását mutatja a vad típusú keményítőből készített gélelhez viszonyítva. A módosított keményítő gél stabilitása jelentősen eltér. A módosított keményítő géljeinek deformálásához szükséges erő nagyobb, mint a vad típusú keményítőből készített megfelelő gél deformálásához szükséges erő.

A transzgenikus növényekben termelt keményítő foszfát tartalma körülbelül megfelel a vad típusú növényekben termelt keményítő esetén nyert értékeknek (lásd az 1. táblázatot). A mérési hiba körülbelül $\pm 5\%$.

Az amilóz tartalom Hovenkamp-Hermelink et al (Potato Res. 31 (1988), 241-246) szerint számítható ki. Az amilóz tartalom 5-40%-kal nő (lásd az 1. táblázatot).

1. táblázat

Növények	nmol glükóz-6-foszfát/mg keményítő	% amilóz
vad típus	9,00	20,4
RE7-10	10,80	21,7
RE7-26	8,23	21,8
RE7-34	8,49	24,3



A RE7-34-es növény vonal mutatja a leg szignifikánsabb eltérést a vad típusú növénytől.

5. példa

A *Solanum tuberosum* egy elágazást megszüntető enzimjét kódoló genom DNS szekvenciák azonosítása és izolálása

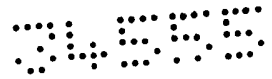
A *Solanum tuberosum* elágazást megszüntető enzimjét kódoló genom DNS szekvenciák azonosítását és izolálását úgy hajtjuk végre, hogy először egy elágazást megszüntető enzim enzimatis aktivitásával rendelkező proteineket izolálunk burgonyából, ezen proteinek peptid szekvenciáját meghatározzuk és ezen peptid szekvenciákból degenerált oligonukleotid szekvenciákat származtatunk, melyeket genom könyvtárak szkrínelésére használunk.

Ez a folyamat részletesen az alábbiakban került leírásra:

(a) Egy *Solanum tuberosum*-ban levő új elágazást megszüntető enzim azonosítása

Egy *Solanum tuberosum*-ban levő új elágazást megszüntető enzim azonosítását az alábbiakban leírt ismert módszerekkel hajtjuk végre:

Protein kivonatokat nyerünk *Solanum tuberosum* gumó szövetéből. Ebből a célból, 820 g gumó szövetet homogenizálunk 1500 ml A pufferben. Ezen homogenizátum 50 ml mennyiségét PAAG-ben (lásd a 0 sávot a 3. ábrán) szeparáljuk. A gél 7,5% akrilamidot (pH 7,9) tartalmaz, mely metilén biszkrilamiddal kapcsolódik 1:75 mértékben, valamint 1% amilopektinnel. Az elektroforézishez való puffer rendszer tris/glicint (pH 7,9) tartalmaz. A gél futtatás után a gélt 50 mM tris/citrát (pH 7,0), 2 mM aszkorbinsav elegyében ekvilibráltatjuk 22 C° hőmérsékleten 4 órán keresztül. A gélt Lugol oldattal festjük 15 percen keresztül. A festés eredményeit a 3. ábrán a 0. sávban mutatjuk be. Az elágazást bejuttató enzim (a diszproporcionáló



(=arányalanító) enzim elágaztató enzimje) aktivitása eredményeként létrejött vöröses sávon túl megfigyelhető egy erősen kék sáv is. A kék festődés az amilopektin alfa-1,6-glükózidos elágazásainak enzimatikus emésztésének eredménye, ami a vöröses vagy bíbor színt eredményezi.

- (b) A *Solanum tuberosum*-ból származó elágazást megszüntető enzim tisztítása és a peptid szekvenciák detektálása

A *Solanum tuberosum*-ból származó elágazást megszüntető enzim tisztítását és a peptid szekvenciák detektálását az alábbi ismert módszereknek megfelelően hajtjuk végre:

A burgonyából származó elágazást megszüntető enzim tisztításához 500 g gumót homogenizálunk 1,5 l B pufferben egy homogenizátorban 1 percen keresztül. A homogenizátumot 6 rétegű muszlin anyagon átszűrjük. Ha szükséges, a pH értéket 5,8 értékre állítjuk. A homogenizátumot 25000 x g értéken centrifugáljuk 30 percen keresztül. Ezután a proteineket a felülúszóból kicsapatjuk ammónium szulfátos kicsapatással 0 °C hőmérsékleten. Ebből a célból az ammónium szulfátot folyamatosan adjuk az felülúszóhoz keverés mellett a telítődési koncentráció 40%-os koncentrációjának eléréséig. Amikor a proteinek kicsapódása megkezdődik az elegyet újabb 30 percig keverjük. A kicsapódott proteinek centrifugálással (25000 x g, 30 perc) történő szeparálása után a kapott felülúszót ammónium szulfáttal keverjük a telítődési koncentráció 50%-os koncentrációjának eléréséig. A kicsapatást újabb 30 percig végezzük. Ezután az elegyet 25000 x g értéken centrifugáljuk 30 percig és a kicsapódott proteineket körülbelül 80 ml B pufferben reszuszpendáljuk. 30000 x g értéken 15 percig tartó centrifugálás után a felülúszót eltávolítjuk és egy B pufferrel ekvibrált affinitás oszlopra helyezzük. Az affinitási oszlop anyaga exopoi aktivált szafaróz 6B (Sigma), melyhez béta-ciklodextrint

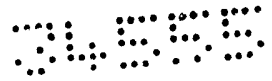
(ciklohepta-amilóz; Sigma) kötöttünk Ludwig et al (Plant Physiol. 74 (1984), 856-861) leírásának megfelelően Az affinitási oszlopot a B pufferrel addig mossuk, míg semmilyen abszorpciót nem mérünk 280 nm hullámhosszúságon. A stacioner fázishoz alacsony affinitást mutató protein frakciót béta-ciklodextrin oldatot használva (1 mg/ml A pufferben) eluáljuk, majd ezután leöntjük. A pufferben levő 10 mg/ml béta-ciklodextrin koncentrációnál a burgonya elágazást megszüntető enzim eluál (cf. 3. ábra).

Az eluátum elágazást megszüntető enzimen gazdag frakcióját elektroforézisnek vetjük alá denaturáló PAAG-ben Laemmli (Nature 227 (1970), 680-685) módszerének megfelelően. A denaturált proteint kivágjuk a gélből és izoláljuk. A peptid szekvenciákat standard technikáknak megfelelően határozzuk meg. A *Solanum tuberosum*-ból származó elágazást megszüntető enzim peptid szekvenciáit az 1. és a 12. számú szekvenciákban mutatjuk be.

- (c) A *Solanum tuberosum* elágazást megszüntető enzimjét kódoló genom DNS szekvenciák azonosítása és izolálása génszabványi eljárás használatával

A (b) szekcióban leírtak szerint nyert peptid szekvenciákat használjuk olyan oligonukleotid szekvenciák származtatására, melyek a burgonya elágazást megszüntető enzimjét kódoló gének régióit képviselik, ha figyelembe vesszük a genetikai kód degeneráltságát. Standard technikáknak megfelelően szintetikus oligonukleotidokat szintetizálunk a származtatott oligonukleotid szekvenciákkal összhangban. Ezeket a szintetikus oligonukleotidokat használjuk a genom könyvtárak szkrínelésére.

Először egy genom cDNS könyvtárat hozunk létre Liu et al (Plant Mol. Biol. 17 (1991), 1139-1154) módszerének megfelelően. Ezt követően, P2392 törzsű *E. coli* sejteket fertőzünk a genom DNS fragmenteket tartalmazó fágokkal és Petri csészékben tápközegre szélesztjük körülbelül 30000 sejt/75



cm² sűrűségben. A Petri csészéket 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk, addig, míg a fág plakkok megfelelő méretűek nem lesznek (körülbelül 6-8 óra). Ezután a Petri csészéket 4 C° hőmérsékleten tároljuk több órán keresztül. Nitrocellulóz membránokat helyezünk a lizált baktérium rétegre, majd egy perc múlva eltávolítjuk. A szűrőket 2 percig 0,2 M NaOH, 1,5 M NaCl elegyében inkubáljuk, majd 2 percig 0,4 M Tris/HCl-ben (pH 7,5) és végül 2 percig 2 x SSC-ben. A szűrőket megszáritjuk UV kereszt-kötjük és 3 órán keresztül H pufferben inkubáljuk a radioaktív vég jelölésű oligonukleotidok hozzáadása előtt. Hibridizáció után, 12 órán keresztül a szűrőket mossuk kétszer 15 percig 0,2 x SSC/0,1% SDS elegyében, majd autoradiográfiának vetjük alá.

A hibridizáció hőmérsékletét és a szűrők mosását az alábbiak alapján lehet kiszámítani:

$$T+15 = 16,6 \times [\text{Na}^+] + 0,41 \times [\% \text{ Gc}_{\text{oligonukleotid}}] + 81,5 - 675/\text{hosszúság}_{\text{oligonukleotid}}$$

Az 1. vagy az 5. számú szekvenciákban leírt burgonya elágazást megszüntető enzim peptid szekvenciája felhasználható megfelelő oligonukleotid szekvenciák származtatására. A lehető legmagasabb hibridizációs hőmérséklet eléréséhez - mely megfelelő specifitást biztosít a hibrid képződéshez - a lehető leghosszabb oligonukleotidok használatára van szükség. A növekvő hosszúsággal, azonban nő a degeneráltság foka is, azaz az eltérő szekvencia kombinációval rendelkező oligonukleotidok száma is nő. A 6000-ig terjedő degeneráltsági fok még elfogadható. Ha egy protein esetében több peptid szekvencia is ismert, megfelelő oligonukleotidok származtathatók, kombinálhatók és használhatók a hibridizációhoz való oligonukleotid keverékhez, így a hibridizáció hatékonyságának fokozásához.

Az 1. számú szekvenciában leírt peptid szekvencia egy részéhez egy 20 bázispárból álló oligonukleotid próbához való szekvenciát származtatunk. Az

oligonukleotid degeneráltsági foka 256 a maximálisan 65%-os és minimálisan 40%-os GC tartalom mellett, ami körülbelül 56 C° maximális hibridizációs hőmérsékletet eredményez. Az 5. számú szekvenciában bemutatott peptid szekvencia egy részéhez egy 20 bázispár hosszúságú oligonukleotid próbához való szekvenciát származtatunk. Az oligonukleotid degeneráltsági foka 384 a maximálisan 55%-os és minimálisan 50%-os GC tartalom mellett, és ez körülbelül 60 C° maximális hibridizációs hőmérsékletet eredményez. Mind a két oligonukleotidot felhasználjuk keverékként a hibridizációhoz 54 C° hőmérsékleten. A szűrőket 45 C° hőmérsékleten mossuk.

A próbák szintéziséhez való szekvencia templát a következő:

1. peptid: NH₂-Asp Ser Asp Asp Val Lys Pro Glu Gly-COOH

(8-16 aminosavak az 1. számú szekvenciában)

mRNS: 5' GAY GAY GUN AAR CCN GAR GG 3'

1. próba: 3' CTR CTR CAN TTY GGN CTY CC 5'

(19. számú szekvencia)

5. peptid: NH₂-Ile Gln Val Gly Met Ala Ala -COOH

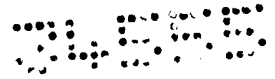
(3-9 aminosavak az 5. számú szekvenciában)

mRNS: 5' AUH CAR GUN GUN AUG GCN GC 3'

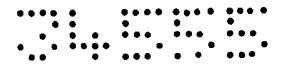
2. próba: 3' TAD GTY CAI CCI TAC CGI CG 5'

(20. számú szekvencia)

Három szkrínelési ciklusban a használt próbákhoz hibridizálódó DNS inzertet tartalmazó fág klónokat egyediesítjük, Ily módon körülbelül 40 plakkot azonosítunk 500000 fág plakk szkrínelése során. Ezeket a pozitív fág klónokat



használjuk a spenótból izolált, elágazást megszüntető enzimet kódoló a cDNS szekvenciához (17. számú szekvencia) való hibridizációhoz. Ily módon három fág klón izolálható, melyek a spenótból származó cDNS szekvenciához hibridizálódnak. Az azonosított lambda fág klónok egyikéből, a λ Depot-ból, standard technikáknak megfelelően DNS-t nyerünk, a DNS inzertet izoláljuk és Sau3A restrikciós endonukleázzal hasítjuk. A kapott alfragmenteket a BamHI-gyel hasított pBluescript vektorba ligáljuk. *E. coli* sejteket transzformálunk a kapott plazmidokkal. A transzformált baktériumokat tápközegre szélesztjük Petri csészében. Annak meghatározásához, hogy melyik baktérium tartalmazza az elágazást megszüntető enzimet kódoló DNS inzertet egy telep hibridizációt hajtunk végre. Ebből a célból egy nitrocellulóz membránt helyezünk a Petri csészében levő szilárd tápközegre. Erre a membránra az *E. coli* sejt telepek transzferálódnak. A Petri csészét 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk egy éjszakán keresztül és a membránon levő *E. coli* sejteket telepekké szaporítjuk. A membránt eltávolítjuk a tápközegről és 5 percig inkubáljuk 10% SDS-ben, 5 percig 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl elegyében, majd 5 percig 0,5 M Tris/HCl-ben (pH 7,5), majd ezt követően 5 percig 2 x SSC-ben. A szűrőket megszáritjuk, UV keresztül kötjük és 3 órán keresztül H pufferben inkubáljuk a radioaktív vég jelölésű oligonukleotidok hozzáadása előtt. A hibridizációhoz az 1-es (19. számú szekvencia) és a 2-es (20. számú szekvencia) radioaktív jelölésű próbákat használjuk. Az 54 C° hőmérsékleten 12 órán keresztül végzett hibridizáció után a szűrőket 45 C° hőmérsékleten kétszer mossuk 15 percig 0,2 x SSC/0,1 SDS-ben, majd autoradiográfiának vetjük alá. A használt próbához hibridizálódó telepek baktériumait tenyésztjük és a sejtekből a plazmid DNS-t izoláljuk. Ily módon, a használt oligonukleotidokhoz hibridizálódó inzerteket tartalmazó különböző plazmidokat



izolálunk. Ezt követően, az izolált plazmidok inzertjeinek DNS szekvenciája egy részét Sanger et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977),5463-5467) módszerének megfelelően meghatározzuk.

6. példa

A *Solanum tuberosum*-ból származó elágazást megszüntető enzimet kódoló cDNS szekvenciák izolálása polimeráz lánc reakciót használva

Az 5. példában nyert részleges genom DNS szekvenciákat az elágazást megszüntető enzimet kódoló spenót cDNS szekvenciához hasonlítjuk. Azt találtuk, hogy az azonosított inzertek közül kettő olyan DNS szekvenciát tartalmaz, melyek a spenót cDNS-ben egymástól körülbelül 500 bázispár távolságra elhelyezkedő két DNS szekvenciával homológok. Ezen szekvenciákból kiindulva két oligonukleotidot szintetizálunk a PCR reakcióhoz. Ezen két oligonukleotid a következő nukleotid szekvenciával rendelkezik:

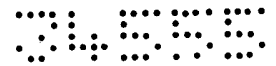
C oligonukleotid (21. számú szekvencia)

5' AAGGTACCGG ATCCTCTGCT GATGGCAAGT GGACATTATT 3'

D oligonukleotid (22. számú szekvencia)

5' TTAAGCCCGG GCGATACGAC AAGGACCATT TGCATTACCA G 3'

A C oligonukleotid az amplifikált DNS fragment egyik végére egy BamHI restrikciós hely bejuttatására szolgál. Ez az oligonukleotid részlegesen homológ a spenót cDNS-sel a 17. számú szekvenciában leírt DNS szekvencia 1082-1110 nukleotidok között. A D oligonukleotid az amplifikálandó DNS fragment másik végére egy SmaI restrikciós hely bejuttatására szolgál. Ez az oligonukleotid homológ a spenót cDNS-sel a 17. számú szekvenciában leírt DNS szekvencia 1545-4571



nukleotidok között. Ezeket az oligonukleotidokat használjuk a burgonya gumó cDNS könyvtárból származó DNS fragment amplifikálásához.

Ebből a célból, egy cDNS könyvtárat hozunk létre a burgonya gumó szövetből származó teljes RNS előállításával Logemann et al (Anal. Biochem. 163 (1987), 16-20) módszerét használva. Standard technikákat használva a teljes RNS-ből poliadenilált mRNS-t hozunk létre, majd cDNS szintéziséhez használjuk a Gubler és Hoffmann (Gene 25 (1983), 263) által leírt módszer szerint. A cDNS-t a kereskedelemben beszerezhető EcoRI/NotI adapterekkel ligáljuk, a Lambda ZAP II (Stratagene) fág DNS EcoRI restrikciós helyére ligáljuk és a fág fejbe zárjuk.

Az így létrehozott cDNS könyvtárból egy körülbelül 500 bázispár hosszúságú DNS fragmentet amplifikálunk PCR-t használva a C és D oligonukleotidokat használva. Ezt a DNS fragmentet a BamHI és SmaI restrikciós endonukleázokkal hasítjuk és egy BamHI-gyel és SmaI-gyel hasított pBluescript vektorba ligáljuk. A kapott plazmidot pDBE-Pot plazmidnak hívjuk (4. ábra).

Az izolált 500 bázispár hosszúságú fragment szolgál a burgonya elágazást megszüntető enzim teljes kódoló régióját tartalmazó cDNS fragment izolálására a fent leírtak szerint megszerkesztett Lambda ZAP II-ben levő cDNS könyvtárból hagyományos molekuláris génebézészeti eljárásokat használva.

7. példa

A pDBE-Pot plazmid cDNS inzertjének szekvencia analízise

A 6. példa szerint nyert *E. coli* klónból a pDBE-Pot (4. ábra) plazmidot izoláljuk és cDNS inzertjét standard didezoxi módszerrel meghatározzuk (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977), 5463-5467). Az inzert 492 bázispár hosszúságú. Nukleotid szekvenciáját a 23. számú szekvenciában mutatjuk be.

A DNS szekvencia analízise azt mutatja, hogy az 1. számú és a 2. számú szekvenciákban bemutatott peptid szekvenciákat a 23. számú szekvenciában bemutatott DNS szekvencia kódolja két pozícióban található eltéréssel. Az 1. számú szekvencia a 23. számú szekvenciában bemutatott aminosav szekvencia 6-26 aminosavainak felel meg és a 2. számú szekvencia a 23. számú szekvenciában bemutatott aminosav szekvencia 80-99 aminosavainak. Az eltérések adódhatnak abból, hogy a proteint a Désirée változatból izoláltuk, a használt cDNS könyvtárat viszont a Berolina változatból szerkesztettük meg.

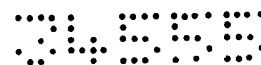
8. példa

A p35S-anti-DBE-Pot plazmid megszerkesztése, burgonya növények transzformálása és a szintetizált keményítő jellemzése

A pDBE-Pot plazmidból BamHI-SmaI emésztéssel egy körülbelül 500 bázispár hosszúságú DNS fragmentet izolálunk, mely fragment a 23. számú szekvenciában bemutatott szekvenciával rendelkezik és a burgonya elágazást megszüntető enzim kódoló régiójának egy részét tartalmazza. Ezt a DNS fragmentet klónozzuk a BamHI/SmaI restrikciós endonukleázokkal hasított pBinAR vektorba (Höfgen and Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230). A pBinAR vektor a Bin19 bináris vektor (Bevan, Nucleic Acids res. 12 (1984), 8711-8721) származéka.

A pBinAR vektort az alábbiak szerint szerkesztjük meg:

A karfiol mozaik vírus 35S promóterének 6909-7437 nukleotidjait tartalmazó 529 bázispár hosszúságú fragmentet (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294) a pDH51 plazmidból egy EcoRI/KpnI fragmentként izoláljuk (Pietrzak et al., Nucl. Acids Res. 14, 5857-5868) és a pBin19 plazmid polikötőjének EcoRI és KpnI restrikciós helyei közé ligáljuk. Így kapjuk a pBin19-A plazmidot.



A pAGV40 plazmidból (Herrera-Estrella et al., Nature 303, 209-213) egy 192 bázispár hosszúságú fragmentet izolálunk a PvuII és HindIII restrikciós endonukleázokat használva, ez a fragment tartalmazza a pTiACH5 Ti plazmid T-DNS-e 3-as génjének poliadenilációs jelét (Gielen et al., EMBO J. 3, 835-846)(11749-11939 nukleotidok). Az SphI kötők PvuII restrikciós helyhez való hozzáadása után a fragmentet az SphI és HindIII restrikciós endonukleázokkal hasított pBin19-A plazmidba ligáljuk, ez eredményezi a pBinAR plazmidot.

A kapott plazmidot p35S-anti-DBE-Pot plazmidnak nevezzük és az 5. ábrán mutatjuk be.

A cDNS fragment inzertálása egy olyan expressziós kazettát eredményez, mely az alábbiak szerint az A, B, és C fragmenteket tartalmazza (5. ábra):

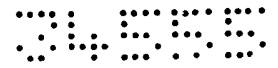
Az A fragment (529 bp) a karfiol mozaik vírus (CaMV) 35S promóterét tartalmazza. A fragment a CaMV 6909-7437 nukleotidjait tartalmazza (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294).

A B fragment a burgonya elágazást megszüntető enzimet kódoló cDNS proteint kódoló régiójának egy részét tartalmazza. Ezt a részt a pDBE-Pot plazmidból izoláljuk BamHI/SmaI fragmentként a fent leírtak szerint, majd a pBinAR plazmidban a promóterhez fuzionáltatjuk anti-sense orientációban.

A C fragment (192 bp) a pTiACH5 Ti plazmid T-DNS-se 3-as génjének poliadenilációs jelét tartalmazza (Gielen et al., EMBO J. (1984), 835-846).

A p35S-antiDBS-Pot plazmid mérete körülbelül 11,5 kb.

A p35S-antiDBE-Pot vektort burgonya növényekbe transzferáljuk *Agrobacterium tumefaciens* által közvetített transzformációval. Intakt növényeket regeneráltatunk a transzformált sejtekből.



Az elágazást megszüntető enzimet kódoló endogén mRNS hiányának megállapítására szolgáló teljes RNS analízis arra használható, hogy megállapítsuk, hogy a növényeket sikeresen módosítottuk-e genetikailag.

A transzformáció eredményeként a transzgenikus burgonya növények csökkent elágazást megszüntető enzim aktivitást mutatnak (cf. 9. ábra).

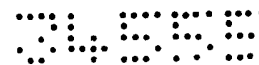
A vad típusú növényekből származó keményítő szemcsékkel szemben, melyek szabályos kerek formájúak, a transzgenikus növények által termelt keményítő szemcsék durva, repedezett, sőt horzsolt felszínnel rendelkeznek (lásd a 10. ábrát).

A transzgenikus növények által szintetizált keményítő a gélképzés alatti ("paszta képzés") viszkozitásban, gél stabilitásában és a foszfát tartalomban is eltér még a vad típusú növények által termelt keményítőtől.

A viszkozitást Rapid Visco Analyser segítségével határozzuk meg a fent leírt módszert használva. Az eredményeket a 11. ábrán mutatjuk be. A 11. ábra a 4. görbében egy tipikus RVA görbét mutat a vad típusú növényekből (Désirée változat) izolált keményítő esetében. A transzformált növény vonalak 1-3 görbéi jelentősen csökkent viszkozitási maximumot mutatnak a 96 C° hőmérsékletre való hevítés után és nagyobb viszkozitás növekedést az 50 C° hőmérsékletre való hűtés után azaz magasabb a végső viszkozitás.

A 12. ábra a gátolt növény vonalak keményítőjéből készített gélek gél stabilitását mutatja a vad típusú növényekből származó keményítőből készített gélekhez viszonyítva. A módosított keményítő gél stabilitása jelentősen eltér. A gél deformálásához szükséges erő jelentősen magasabb, mint a vad típusú keményítőből készített megfelelő gél deformálásához szükséges erő.

A transzgenikus növények által szintetizált keményítő foszfát tartalma - az antisense gátlás mértékétől függ ez is - a vad típusú növények által termelt keményítő értékei fölé esik (lásd a 2. táblázatot). A mérés hibája körülbelül $\pm 5\%$.



Az amilóz tartalmat Hovenkapm-Hermelink et al (Potato Res. 31 (1988), 241-246) módszerének megfelelően számítjuk ki. A transzgenikus növény vonaltól függően, az amilóz tartalom körülbelül azonos, vagy kissé magasabb, mint a vad típusú keményítő amilóz tartalma (lásd a 2. táblázatot).

2. táblázat

Növények	nmol glükóz-6- -foszfát/mg keményítő	% amilóz
vad típus	9,00	20,4
RE500-47	14,66	21,7
RE500-81	11,19	19,7
RE500-75	10,42	22,5

SZEKVENCIA LISTA

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

(i) FELTALÁLÓ:

(A) NÉV: Institut fuer Genbiologische
Forschung Berlin GmbH

(B) UTCA: Ihnestr. 63

(C) VÁROS: Berlin

(E) ORSZÁG: Németország

(F) IRÁNYÍTÓSZÁM: 14195

(G) TELEFON: +49 30 83000760

(H) TELEFAX: +49 30 83000736

(ii) A TALÁLmány CÍME: Növényekből származó elágazást megszüntető enzimeket kódoló DNS molekulák

(iii) A SZEKVENCIAK SZÁMA: 24

(iv) SZÁMÍTÓGÉPES OLVASÁSI FORMA:

(A) A HORDOZÓ KÖZEG: Floppy lemez

(B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC kompatibilis

(C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS

#1.30

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Verzió
(EPO)

(vi) ELSŐBBSÉGI ADATOK:

(A) AZ ALKALMAZÁS SZÁMA: DE P4447387.7

(B) IKTATÁSI DÁTUM: 22-DEC-1995

(2) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 21 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(iii) HIPOTETIKUS: nincs

(iv) ANTISENSE: nincs

(v) A FRAGMENT TÍPUSA: belső

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) ORGANIZMUS: Solanum tuberosum

(B) TÖRZS: cv Desirée

(C) SZÖVET TÍPUS: gumó



(xi) A 11. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
 Tyr Gly Leu Pro Val Gln Val Phe Glu
 1 5

(2) A 12. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 (A) HOSSZÚSÁG: 13 aminosav
 (B) TÍPUS: aminosav
 (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
 (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(iii) HIPOTETIKUS: nincs

(iv) ANTISENSE: nincs

(v) A FRAGMENT TÍPUSA: belső

(vi) EREDETI FORRÁS:
 (A) ORGANIZMUS: Solanum tuberosum
 (B) TÖRZS: cv Desirée
 (C) SZÖVET TÍPUS: gumó

(xi) A 12. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Arg Thr Leu Leu Val Asn Leu Asn Ser Asp Asp Val Lys
 1 5 10

(2) A 13. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 (A) HOSSZÚSÁG: 9 aminosav
 (B) TÍPUS: aminosav
 (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
 (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

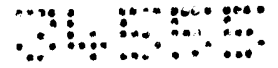
(iii) HIPOTETIKUS: nincs

(iv) ANTISENSE: nincs

(v) A FRAGMENT TÍPUSA: belső

(vi) EREDETI FORRÁS:
 (A) ORGANIZMUS: Spinacia oleracea
 (C) SZÖVET TÍPUS: levél

(xi) A 13. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:



Gln Pro Ile Glu Thr Ile Asn Tyr Val
1 5

(2) A 14. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 7 aminosav
- (B) TÍPUS: aminosav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

- (ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid
- (iii) HIPOTETIKUS: nincs
- (iv) ANTISENSE: nincs
- (v) A FRAGMENT TÍPUSA: belső
- (vi) EREDETI FORRÁS:
 - (A) ORGANIZMUS: Spinacia oleracea
 - (C) SZÖVET TÍPUS: levél

(xi) A 14. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Asn Ile Asp Gly Val Glu Gly
1 5

(2) A 15. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 20 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

- (ii) A MOLEKULA TÍPUSA: más nukleinsav
 - (A) LEÍRÁS: /desc = " oligonukleotid"
- (iii) HIPOTETIKUS: van
- (iv) ANTISENSE: nincs
- (xi) A 15. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

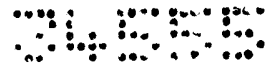
ATWGYTCRA TWGGYTGCA

20

(2) A 16. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

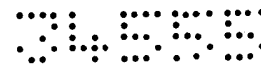
- (A) HOSSZÚSÁG: 20 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú



- (D) TOPOLÓGIA: lineáris
- (ii) A MOLEKULA TÍPUSA: más nukleinsav
 - (A) LEÍRÁS: /desc = " oligonukleotid"
- (iii) HIPOTETIKUS: van
- (iv) ANTISENSE: nincs
- ...(ix) JELLEMZŐ:
 - (A) NÉV/KULCS: módosított bázis
 - (B) LOKÁCIÓ: 15
 - (D) EGYÉB INFORMÁCIÓK: /mod-bázis = i
- (xi) A 16. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:
AAAYTYGATG GWGTGGARGG

20

- (2) A 17. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:
 - (I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 - (A) HOSSZÚSÁG: 3437 bázispár
 - (B) TÍPUS: nukleinsav
 - (C) SZÁLTÍPUS: kétszálú
 - (D) TOPOLÓGIA: lineáris
 - (ii) A MOLEKULA TÍPUSA: cDNS - mRNS
 - (iii) HIPOTETIKUS: nincs
 - (iv) ANTISENSE: nincs



(vi) EREDETI FORRÁS:

- (A) ORGANIZMUS: Spinacia oleracea
(C) SZÖVET TÍPUS: levél

...(ix) JELLEMZŐ:

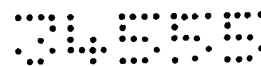
- (A) NÉV/KULCS: CDS
(B) LOKÁCIÓ: 201 3095
(D) EGYÉB INFORMÁCIÓK: /termék= "elágazást megszüntető enzim (R-Enzim)"

(xi) A 17. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

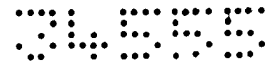
AAAACATTCC GATTAGCGGC AAATAACAAA CCCCAAACAA ACTCTAACCA TGAAATCTCA	60
TCTTTTTAAC ATCATTTTTC ATCGAAATCT ACGTTCTGTA ACTAATTTTC CCACTTTACA	120
GCATCATTCT TCATCTGCTC AACTGAATTT TCTGCTTAA CCGCCATAGC CAAAACTTC	180
AACCTCACAT TATCGCTCTA ATG TCT TCA CTA TAT AAC CCC ATT GCT CTT	230
Met Ser Ser Leu Tyr Asn Pro Ile Ala Leu	
1 5 10	
GCT TCT AGT TTC CAT CAC CAT TAT CCT AAT CTT CGT TTT CTA CCC TTT	278
Ala Ser Ser Phe His His His Tyr Pro Asn Leu Arg Phe Leu Pro Phe	
15 20 25	
AAT TTC AAT TTT ATT ACC AAA TTA CCC GTT TCT AAT TCC TTT GCT ATT	326
Asn Phe Asn Phe Ile Thr Lys Leu Pro Val Ser Asn Ser Phe Ala Ile	
30 35 40	
GGG TCT AGT TCT AGA AGC TTC CAT TCA TCG CCA TTG AAG AAG GAT TCT	374
Gly Ser Ser Ser Arg Ser Phe His Ser Ser Pro Leu Lys Lys Asp Ser	
45 50 55	
TCT TGC TTT TGT TGT TCC ATG GCT GTC GAA GTT GGT TCT GCT TCT TCT	422
Ser Cys Phe Cys Cys Ser Met Ala Val Glu Val Gly Ser Ala Ser Ser	
60 65 70	
GTT TCT CAG AGT GAA TTG CAA GGA AGT TTG AAT AGT TGT AGA GCG TAT	470
Val Ser Gln Ser Glu Leu Gln Gly Ser Leu Asn Ser Cys Arg Ala Tyr	
75 80 85 90	
TGG CCT AGC AAG TAT ACA TTT GCC TGG AAT GTT GAT ATT GGT AAT GGT	518
Trp Pro Ser Lys Tyr Thr Phe Ala Trp Asn Val Asp Ile Gly Asn Gly	
95 100 105	
TCA TAT TAC TTA TTT GCA AGT AAA ACT GCT GCC CTA AAG TTT ACA GAT	566
Ser Tyr Tyr Leu Phe Ala Ser Lys Thr Ala Ala Leu Lys Phe Thr Asp	
110 115 120	
GCT GGG ATA GAA GGA TAC GAC GTG AAA ATC AAG CTT GAC AAG GAC CAA	614
Ala Gly Ile Glu Gly Tyr Asp Val Lys Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln	
125 130 135	
GGG GGA TTG CCA GCA AAT GTC ACT GAA AAA TTT CCT CAT ATT AGA GGT	662
Gly Gly Leu Pro Ala Asn Val Thr Glu Lys Phe Pro His Ile Arg Gly	
140 145 150	
TAC TCG GCC TTT AAA GCT CCA GCC ACA CTG GAT GTT GAT AGT CTG CTG	710
Tyr Ser Ala Phe Lys Ala Pro Ala Thr Leu Asp Val Asp Ser Leu Leu	
155 160 165 170	
AAG TGT CAA CTT GCA GTT GCT GCT TTC AGT GCT GAC GGG GCT TGC AGA	758
Lys Cys Gln Leu Ala Val Ala Ala Phe Ser Ala Asp Gly Ala Cys Arg	
175 180 185	
AAT GCT ACT GGT TTG CAG TTG CCT GGC GTT ATT GAT GAG TTG TAT TCA	806
Asn Ala Thr Gly Leu Gln Leu Pro Gly Val Ile Asp Glu Leu Tyr Ser	
190 195 200	



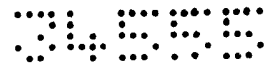
TAT Tyr	GAT Asp	GGC Gly	CCT Pro	CTG Leu	GGT Gly	GCT Ala	GTT Val	TTC Phe	TCA Ser	GAA Glu	AAC Asn	ACC Thr	ATA Ile	TCA Ser	CTG Leu	854
		205					210					215				
TAC Tyr	CTA Leu	TGG Trp	GCT Ala	CCT Pro	ACT Thr	GCT Ala	CAA Gln	GCT Ala	GTT Val	TCT Ser	GCC Ala	AGC Ser	ATA Ile	TTT Phe	AAG Lys	902
	220					225					230					
GAT Asp	CCA Pro	TCA Ser	GGT Gly	GGT Gly	GAA Glu	CCA Pro	TTA Leu	CAA Gln	ACC Thr	GTC Val	CAG Gln	CTT Leu	ATA Ile	GAG Glu	TCA Ser	950
	235				240					245					250	
AAT Asn	GGT Gly	GTT Val	TGG Trp	AGC Ser	GCT Ala	GTG Val	GGG Gly	CCA Pro	AGA Arg	ACC Thr	TGG Trp	GAG Glu	GGG Gly	TGT Cys	TAT Tyr	998
				255					260					265		
TAT Tyr	GTT Val	TAT Tyr	GAA Glu	ATC Ile	ACT Thr	GTC Val	TAT Tyr	CAC His	CAT His	AGC Ser	ACC Thr	TTG Leu	AGA Arg	ATT Ile	GAA Glu	1046
			270					275					280			
AAA Lys	AGC Ser	TTT Phe	GCT Ala	ATT Ile	GAT Asp	CCA Pro	TAT Tyr	GCC Ala	AGA Arg	GGG Gly	ATT Ile	TCA Ser	GCT Ala	GAT Asp	GTA Val	1094
		285					290					295				
AAG Lys	CGA Arg	ACA Thr	TTA Leu	TTG Leu	GCT Ala	GAC Asp	TTA Leu	AGC Ser	TCT Ser	GAA Glu	ACT Thr	CTA Leu	AAG Lys	CCT Pro	GAA Glu	1142
	300					305					310					
GGA Gly	TGG Trp	GAA Glu	AAT Asn	CTT Leu	GCT Ala	GAT Asp	GAA Glu	AAA Lys	CCT Pro	CAT His	CTT Leu	CTT Leu	TCT Ser	CCA Pro	TCT Ser	1190
	315				320				325						330	
GAC Asp	ATC Ile	AGT Ser	CTC Leu	TAT Tyr	GAG Glu	CTG Leu	CAT His	ATA Ile	AGA Arg	GAT Asp	TTC Phe	AGT Ser	GCT Ala	TAT Tyr	GAC Asp	1238
			335					340					345			
CTC Leu	ACT Thr	GTG Val	CAC His	CCT Pro	GAC Asp	CTT Leu	CGT Arg	GGT Gly	GGA Gly	TAT Tyr	CTT Leu	GCT Ala	TTC Phe	ACT Thr	TCA Ser	1286
			350					355					360			
CAG Gln	GAC Asp	TCA Ser	GCT Ala	GGT Gly	GTT Val	AAT Asn	CAT His	TTG Leu	GAA Glu	AAG Lys	TTA Leu	TCT Ser	GCT Ala	GCT Ala	GGT Gly	1334
		365					370					375				
CTT Leu	ACT Thr	CAC His	GTT Val	CAT His	CTG Leu	CTG Leu	CCA Pro	AGC Ser	TTC Phe	CAG Gln	TTT Phe	GCT Ala	GAA Glu	GTT Val	GAT Asp	1382
	380					385					390					
GAT Asp	GAC Asp	AAA Lys	AAG Lys	AAG Lys	TGG Trp	AAA Lys	TTT Phe	GTT Val	GAT Asp	ACT Thr	AAG Lys	AGG Arg	TTT Phe	GAA Glu	ACA Thr	1430
	395				400					405				410		
CTA Leu	CCA Pro	CCT Pro	GAT Asp	TCA Ser	GAA Glu	GAG Glu	CAA Gln	CAA Gln	GCT Ala	CAA Gln	ATA Ile	ACT Thr	GCC Ala	ATC Ile	CGA Arg	1478
				415					420					425		
GAT Asp	GAA Glu	GAT Asp	GGA Gly	TAT Tyr	AAC Asn	TGG Trp	GGG Gly	TAT Tyr	AAT Asn	CCT Pro	GTT Val	TTG Leu	TGG Trp	GGA Gly	ACT Thr	1526
			430					435					440			
CCT Pro	AAG Lys	GGA Gly	AGC Ser	TAT Tyr	GCA Ala	ACA Thr	GAT Asp	CCA Pro	AAT Asn	GGT Gly	CCA Pro	TGC Cys	CGT Arg	ATA Ile	ATT Ile	1574
		445					450					455				
GAG Glu	TTC Phe	AGA Arg	AAG Lys	ATG Met	GTC Val	CAG Gln	GCG Ala	CTA Leu	AAT Asn	CGT Arg	ATT Ile	GGT Gly	CTT Leu	CGC Arg	GTA Val	1622
	460					465					470					



GTT TTG GAT GTT GTT TAT AAC CAT TTA AAT AGC AGT GGG CCC TCC GAT Val Leu Asp Val Val Tyr Asn His Leu Asn Ser Ser Gly Pro Ser Asp 475 480 485 490	1670
GAT AAT TCT GTC CTG GAC AAG ATT GTT CCA GGT TAC TAC TTA AGA AGA Asp Asn Ser Val Leu Asp Lys Ile Val Pro Gly Tyr Tyr Leu Arg Arg 495 500 505	1718
GAT AAT GAT GGT GCT ATT GAA AAT AGC ACA TGT GTG AAT GAC ACA GCT Asp Asn Asp Gly Ala Ile Glu Asn Ser Thr Cys Val Asn Asp Thr Ala 510 515 520	1766
AGC GAG CAT TTT ATG GTT GAA CGC CTG ATT TTG GAT GAT CTA AAA CAT Ser Glu His Phe Met Val Glu Arg Leu Ile Leu Asp Asp Leu Lys His 525 530 535	1814
TGG GCG GTG AAT TAT AAG GTT GAT GGT TTC AGA TTT GAT CTT ATG GGC Trp Ala Val Asn Tyr Lys Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Gly 540 545 550	1862
CAC ATA ATG AAA CAT ACG ATG GTG AAA GCG ACA AAT ATG CTC CAA GGC His Ile Met Lys His Thr Met Val Lys Ala Thr Asn Met Leu Gln Gly 555 560 565 570	1910
CTG TCA AAA AAC ATA GAT GGT GTA GAG GGT TCA AGC ATT TAT TTA TAT Leu Ser Lys Asn Ile Asp Gly Val Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Leu Tyr 575 580 585	1958
GGT GAA GGA TGG GAC TTT GGC GAG GTG GCA AAT AAT GCA CGT GGA GTA Gly Glu Gly Trp Asp Phe Gly Glu Val Ala Asn Asn Ala Arg Gly Val 590 595 600	2006
AAT GCA TCT CAA CTG AAT CTT GGA GGA ACA GGA ATT GGA AGT TTT AAT Asn Ala Ser Gln Leu Asn Leu Gly Gly Thr Gly Ile Gly Ser Phe Asn 605 610 615	2054
GAT CGG ATT CGA GAT GCA GTG CTT GGT GGG GGG CCT TTT GGT CCC CCT Asp Arg Ile Arg Asp Ala Val Leu Gly Gly Gly Pro Phe Gly Pro Pro 620 625 630	2102
CTT CAG CAA GGT TAC GTG ACT GGT TTA TCT TTA CAG CCT AAT GAT CAT Leu Gln Gln Gly Tyr Val Thr Gly Leu Ser Leu Gln Pro Asn Asp His 635 640 645 650	2150
GAC CAT AGC GGT AAA GCC AAT GCA GAC CGT ATG CTT GCT GTG GCA AAA Asp His Ser Gly Lys Ala Asn Ala Asp Arg Met Leu Ala Val Ala Lys 655 660 665	2198
GAT CAT ATC CAG GTT GGG ATG GCT GGA AAC TTG AGA GAC TAC ATT CTG Asp His Ile Gln Val Gly Met Ala Gly Asn Leu Arg Asp Tyr Ile Leu 670 675 680	2246
ACA AAC TGT GAT GGA AAA CAG GTA AAA GGC TCA GAA GTT TAT ACC TAT Thr Asn Cys Asp Gly Lys Gln Val Lys Gly Ser Glu Val Tyr Thr Tyr 685 690 695	2294
GGG GGA ACG CCG GTT GGG TAT GCT ATG CAG CCG ATA GAA ACT ATC AAC Gly Gly Thr Pro Val Gly Tyr Ala Met Gln Pro Ile Glu Thr Ile Asn 700 705 710	2342
TAT GTC TCA GCT CAT GAC AAC GAA ACT CTT TTC GAT ATT GTC AGT TTG Tyr Val Ser Ala His Asp Asn Glu Thr Leu Phe Asp Ile Val Ser Leu 715 720 725 730	2390
AAG ACT CCT ACC TAC ATT ACG GTG GAT GAG AGA TGT AGG GTA AAT CAT Lys Thr Pro Thr Tyr Ile Thr Val Asp Glu Arg Cys Arg Val Asn His 735 740 745	2438



TTA GCT ACG AGT ATT CTA GCA CTT TCC CAG GGA ATA CCC TTT TTC CAT Leu Ala Thr Ser Ile Leu Ala Leu Ser Gln Gly Ile Pro Phe Phe His 750 755 760	2486
GCT GGT GAT GAG TTG CTA CGT TCA AAG TCC CTT GAC CGT GAT TCT TAT Ala Gly Asp Glu Leu Leu Arg Ser Lys Ser Leu Asp Arg Asp Ser Tyr 765 770 775	2534
AAC TCT GGT GAT TGG TTT AAC AGA TTA GAC TTC AGC TAT AAC TCC AAC Asn Ser Gly Asp Trp Phe Asn Arg Leu Asp Phe Ser Tyr Asn Ser Asn 780 785 790	2582
AAT TGG GGT GTT GGT CTC CCT CCC AAG GAT CAC AAT GAG AGC AAT TGG Asn Trp Gly Val Gly Leu Pro Pro Lys Asp His Asn Glu Ser Asn Trp 795 800 805 810	2630
CCA TTA ATC AAG AAA AGA TTG GCA AAT CCG TCC TAC AAG CCT GAC AAG Pro Leu Ile Lys Lys Arg Leu Ala Asn Pro Ser Tyr Lys Pro Asp Lys 815 820 825	2678
AAT CAC ATT ATT GCT GCT GTT GAA AAT TTC ACC AAT TTG TTG CAA ATT Asn His Ile Ile Ala Ala Val Glu Asn Phe Thr Asn Leu Leu Gln Ile 830 835 840	2726
AGA TAC TCT TCT CCA CTA TTC CGT TTA AGA AGT GCA AAG GAT ATT GAG Arg Tyr Ser Ser Pro Leu Phe Arg Leu Arg Ser Ala Lys Asp Ile Glu 845 850 855	2774
GAT CGA GTA CGA TTC CAC AAT AAT GTT CCA TCT TGG ATT CCT GGG CTT Asp Arg Val Arg Phe His Asn Asn Val Pro Ser Trp Ile Pro Gly Leu 860 865 870	2822
ATA GCT ATG AGC ATT GAA GAT GGT CAT GCG GGA GCC CCT GGC TTG TCA Ile Ala Met Ser Ile Glu Asp Gly His Ala Gly Ala Pro Gly Leu Ser 875 880 885 890	2870
CAG ATA GAT CCC AAG TTC CAG TAC ATT GTT GTA ATA ATC AAT GTT CAG Gln Ile Asp Pro Lys Phe Gln Tyr Ile Val Val Ile Ile Asn Val Gln 895 900 905	2918
CCT ACT GAA ACC AAA TTT GTT AAC CCA GAT CTG CGA GCT AAA TCC CTA Pro Thr Glu Thr Lys Phe Val Asn Pro Asp Leu Arg Ala Lys Ser Leu 910 915 920	2966
CAG CTG CAT CCA GTA CAG TCA ACA TCA GGG GAC ACG GTT GTT AAG GAA Gln Leu His Pro Val Gln Ser Thr Ser Gly Asp Thr Val Val Lys Glu 925 930 935	3014
TCA AAG TAT GAG CCT TCT ACT GGA TGC TTT ACT ATA CCT CCT AAA TCA Ser Lys Tyr Glu Pro Ser Thr Gly Cys Phe Thr Ile Pro Pro Lys Ser 940 945 950	3062
ACT GCA GTG TTC GTT GAG CCA CGG CAT GTT TAA GCTGAAGTTG AAGGGTCTGT Thr Ala Val Phe Val Glu Pro Arg His Val * 955 960 965	3115
CCAAGACGGC GACCGCATGT GGTGTCAGT AAGTGGAGTT ACTTTCTGCA TATTACACGG	3175
TTCAATACAA ATAAATAACG TCTGCTACCG CAGCGAGCTG AGGTCTCACA GAATAAGTTA	3235
CAAAAAAGTT AGCAGTTATA TTTCATAAGT TCATAGTTCA GCTGAATAAG AACCAACAAA	3295
ATCTTACGTT GTACTTGTAG CAGTGCTTTT GTCACGCATA AATAATCAGT TGCTTGTTAA	3355
CCATACATCC GATATGAATG AATAATTTTT TTTTTTTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	3415
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA	3437



(2) A 18. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 965 aminosav
 (B) TÍPUS: aminosav
 (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: protein

(xi) A 18. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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



Asp Glu Lys Pro His Leu Leu Ser Pro Ser Asp Ile Ser Leu Tyr Glu
 325 330 335
 Leu His Ile Arg Asp Phe Ser Ala Tyr Asp Leu Thr Val His Pro Asp
 340 345 350
 Leu Arg Gly Gly Tyr Leu Ala Phe Thr Ser Gln Asp Ser Ala Gly Val
 355 360 365
 Asn His Leu Glu Lys Leu Ser Ala Ala Gly Leu Thr His Val His Leu
 370 375 380
 Leu Pro Ser Phe Gln Phe Ala Glu Val Asp Asp Asp Lys Lys Lys Trp
 385 390 395 400
 Lys Phe Val Asp Thr Lys Arg Phe Glu Thr Leu Pro Pro Asp Ser Glu
 405 410 415
 Glu Gln Gln Ala Gln Ile Thr Ala Ile Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Asn
 420 425 430
 Trp Gly Tyr Asn Pro Val Leu Trp Gly Thr Pro Lys Gly Ser Tyr Ala
 435 440 445
 Thr Asp Pro Asn Gly Pro Cys Arg Ile Ile Glu Phe Arg Lys Met Val
 450 455 460
 Gln Ala Leu Asn Arg Ile Gly Leu Arg Val Val Leu Asp Val Val Tyr
 465 470 475 480
 Asn His Leu Asn Ser Ser Gly Pro Ser Asp Asp Asn Ser Val Leu Asp
 485 490 495
 Lys Ile Val Pro Gly Tyr Tyr Leu Arg Arg Asp Asn Asp Gly Ala Ile
 500 505 510
 Glu Asn Ser Thr Cys Val Asn Asp Thr Ala Ser Glu His Phe Met Val
 515 520 525
 Glu Arg Leu Ile Leu Asp Asp Leu Lys His Trp Ala Val Asn Tyr Lys
 530 535 540
 Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Gly His Ile Met Lys His Thr
 545 550 555 560
 Met Val Lys Ala Thr Asn Met Leu Gln Gly Leu Ser Lys Asn Ile Asp
 565 570 575
 Gly Val Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Leu Tyr Gly Glu Gly Trp Asp Phe
 580 585 590
 Gly Glu Val Ala Asn Asn Ala Arg Gly Val Asn Ala Ser Gln Leu Asn
 595 600 605
 Leu Gly Gly Thr Gly Ile Gly Ser Phe Asn Asp Arg Ile Arg Asp Ala
 610 615 620
 Val Leu Gly Gly Gly Pro Phe Gly Pro Pro Leu Gln Gln Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Thr Gly Leu Ser Leu Gln Pro Asn Asp His Asp His Ser Gly Lys Ala
 645 650 655
 Asn Ala Asp Arg Met Leu Ala Val Ala Lys Asp His Ile Gln Val Gly
 660 665 670
 Met Ala Gly Asn Leu Arg Asp Tyr Ile Leu Thr Asn Cys Asp Gly Lys
 675 680 685

Gln Val Lys Gly Ser Glu Val Tyr Thr Tyr Gly Gly Thr Pro Val Gly
690 695 700

Tyr Ala Met Gln Pro Ile Glu Thr Ile Asn Tyr Val Ser Ala His Asp
705 710 715 720

Asn Glu Thr Leu Phe Asp Ile Val Ser Leu Lys Thr Pro Thr Tyr Ile
725 730 735

Thr Val Asp Glu Arg Cys Arg Val Asn His Leu Ala Thr Ser Ile Leu
740 745 750

Ala Leu Ser Gln Gly Ile Pro Phe Phe His Ala Gly Asp Glu Leu Leu
755 760 765

Arg Ser Lys Ser Leu Asp Arg Asp Ser Tyr Asn Ser Gly Asp Trp Phe
770 775 780

Asn Arg Leu Asp Phe Ser Tyr Asn Ser Asn Asn Trp Gly Val Gly Leu
785 790 795 800

Pro Pro Lys Asp His Asn Glu Ser Asn Trp Pro Leu Ile Lys Lys Arg
805 810 815

Leu Ala Asn Pro Ser Tyr Lys Pro Asp Lys Asn His Ile Ile Ala Ala
820 825 830

Val Glu Asn Phe Thr Asn Leu Leu Gln Ile Arg Tyr Ser Ser Pro Leu
835 840 845

Phe Arg Leu Arg Ser Ala Lys Asp Ile Glu Asp Arg Val Arg Phe His
850 855 860

Asn Asn Val Pro Ser Trp Ile Pro Gly Leu Ile Ala Met Ser Ile Glu
865 870 875 880

Asp Gly His Ala Gly Ala Pro Gly Leu Ser Gln Ile Asp Pro Lys Phe
885 890 895

Gln Tyr Ile Val Val Ile Ile Asn Val Gln Pro Thr Glu Thr Lys Phe
900 905 910

Val Asn Pro Asp Leu Arg Ala Lys Ser Leu Gln Leu His Pro Val Gln
915 920 925

Ser Thr Ser Gly Asp Thr Val Val Lys Glu Ser Lys Tyr Glu Pro Ser
930 935 940

Thr Gly Cys Phe Thr Ile Pro Pro Lys Ser Thr Ala Val Phe Val Glu
945 950 955 960

Pro Arg His Val *
965

(2) A 19. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 20 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: más nukleinsav
(A) LEÍRÁS: /desc = " oligonukleotid"

(iii) HIPOTETIKUS: van

(iv) ANTISENSE: nincs

(xi) A 19. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

CCYTCNGGYT TNACRTCRTC

20

(2) A 20. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 20 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: más nukleinsav

- (A) LEÍRÁS: /desc = " oligonukleotid"

(iii) HIPOTETIKUS: van

(iv) ANTISENSE: nincs

...(ix) JELLEMZŐ:

- (A) NÉV/KULCS: módosított bázis
- (B) LOKÁCIÓ: 3
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓK: /mod bázis = i

...(ix) JELLEMZŐ:

- (A) NÉV/KULCS: módosított bázis
- (B) LOKÁCIÓ: 9
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓK: /mod bázis = i

...(ix) JELLEMZŐ:

- (A) NÉV/KULCS: módosított bázis
- (B) LOKÁCIÓ: 11
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓK: /mod bázis = i

(xi) A 20. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GCGGCCATGC CGACYTGDAT

20

(2) A 21. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 43 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
- (D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: más nukleinsav

- (A) LEÍRÁS: /desc = " oligonukleotid"

(iii) HIPOTETIKUS: van

(iv) ANTISENSE: nincs



(xi) A 21. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

AAGGTACCGG ATCCTCTGCT GATGGCAAGT GGACATTATT AGT 43

(2) A 22. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 41 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: más nukleinsav

(A) LEÍRÁS: /desc = "oligonukleotid"

(iii) HIPOTETIKUS: van

(iv) ANTISENSE: nincs

(xi) A 22. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TTAAGCCCGG GCGATACGAC AAGGACCATT TGCATTACCA G 41

(2) A 23. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

- (A) HOSSZÚSÁG: 492 bázispár
- (B) TÍPUS: nukleinsav
- (C) SZÁLTÍPUS: egyszálú
- (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: cDNS - mRNS

(iii) HIPOTETIKUS: nincs

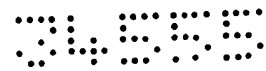
(iv) ANTISENSE: nincs

(vi) EREDETI FORRÁS:

- (A) ORGANIZMUS: Solanum tuberosum
- (B) TÖRZS: Berolina
- (F) SZÖVET TÍPUS: gumó

... (ix) JELLEMZŐ:

- (A) NÉV/KULCS: CDS
- (B) LOKÁCIÓ: 1..492
- (D) EGYÉB INFORMÁCIÓK: /termék = "elágazást megszüntető enzim (R-enzim)"



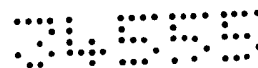
(xi) A 23. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

TCT	GCT	GAT	GGC	AAG	TGG	ACA	TTA	TTA	GTT	AAT	CTT	GAT	TCT	GAT	GAT	48
Ser	Ala	Asp	Gly	Lys	Trp	Thr	Leu	Leu	Val	Asn	Leu	Asp	Ser	Asp	Asp	
				5					10					15		
GTA	AAA	CCT	GAA	GGC	TGG	GAT	AAT	CTA	CAA	GAC	GTG	AAG	CCA	AAT	CTT	96
Val	Lys	Pro	Glu	Gly	Trp	Asp	Asn	Leu	Gln	Asp	Val	Lys	Pro	Asn	Leu	
			20					25					30			
CTT	TCC	TTT	TCT	GAT	GTC	AGC	ATC	TAT	GAG	CTG	CAT	GTT	AGA	GAT	TTC	144
Leu	Ser	Phe	Ser	Asp	Val	Ser	Ile	Tyr	Glu	Leu	His	Val	Arg	Asp	Phe	
			35				40					45				
ACT	GCC	AGT	GAC	CCT	ACT	GTG	TCT	CAT	GAA	TTT	CAG	GCC	GGT	TAT	CTC	192
Thr	Ala	Ser	Asp	Pro	Thr	Val	Ser	His	Glu	Phe	Gln	Ala	Gly	Tyr	Leu	
	50					55					60					
GCC	CCT	TCC	ACG	TCG	CAG	GCA	TCA	GCT	GGT	GTC	CAA	CAT	TTG	AAA	AGA	240
Ala	Pro	Ser	Thr	Ser	Gln	Ala	Ser	Ala	Gly	Val	Gln	His	Leu	Lys	Arg	
	65				70					75					80	
TTA	TCA	AGT	GCT	GGT	ATC	ACT	CAT	GTC	CAC	CTG	TGG	CCA	ACC	TAT	CAA	288
Leu	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	Thr	His	Val	His	Leu	Trp	Pro	Thr	Tyr	Gln	
				85				90						95		
TTT	GCT	GGT	GTC	GAA	GAT	GAG	AAA	CAT	AAA	TGG	AAG	TAT	ACA	GAT	ATC	336
Phe	Ala	Gly	Val	Glu	Asp	Glu	Lys	His	Lys	Trp	Lys	Tyr	Thr	Asp	Ile	
			100					105					110			
GAG	AAA	CTC	AAC	TCT	TTT	CCA	CCA	GAT	TCT	GAG	GAG	CAG	CAG	GCT	CTT	384
Glu	Lys	Leu	Asn	Ser	Phe	Pro	Pro	Asp	Ser	Glu	Glu	Gln	Gln	Ala	Leu	
		115					120					125				
ATC	ACA	GCC	ATC	CAA	GAT	GAA	GAT	GGC	TAT	AAT	TGG	GGG	TAT	AAT	CCT	432
Ile	Thr	Ala	Ile	Gln	Asp	Glu	Asp	Gly	Tyr	Asn	Trp	Gly	Tyr	Asn	Pro	
	130					135					140					
GTT	CTC	TGG	GGA	GTT	CCA	AAG	GGA	AGC	TAT	GCT	GGT	AAT	GCA	AAT	GGT	480
Val	Leu	Trp	Gly	Val	Pro	Lys	Gly	Ser	Tyr	Ala	Gly	Asn	Ala	Asn	Gly	
	145				150					155					160	
CCT	TGT	CGT	ATC													492
Pro	Cys	Arg	Ile													

(2) A 24. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

- (I) A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:
 (A) HOSSZÚSÁG: 164 aminosav
 (B) TÍPUS: aminosav
 (D) TOPOLÓGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: protein



(xi) A 24. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

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

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy elágazást megszüntető enzim biológiai aktivitásával rendelkező, vagy ennek egy biológiailag aktív fragmentjét tartalmazó növényi proteint kódoló DNS molekula azzal jellemezve, hogy az alábbi

- (a) a 18. számú szekvenciában bemutatott aminosav szekvenciával rendelkező proteint kódoló DNS molekulákat;
- (b) a 17. számú szekvenciában bemutatott nukleotid szekvenciával rendelkező DNS molekulákat;
- (c) a 24. számú szekvenciában bemutatott aminosav szekvenciát tartalmazó proteint kódoló DNS molekulákat;
- (d) a 23. számú szekvenciában bemutatott nukleotid szekvenciával rendelkező DNS molekulákat;
- (e) a genetikai kód degeneráltsága következtében az (a), (b), (c) vagy a (d) pontoknak megfelelő DNS molekulák nukleotid szekvenciájától eltérő nukleotid szekvenciával rendelkező DNS molekulákat; és
- (f) az (a), (b), (c), (d) vagy (e) pontoknak megfelelő DNS molekulákhoz hibridizáló DNS molekulákat magába foglaló csoportból szelektáljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti DNS molekula azzal jellemezve, hogy az elágazást megszüntető enzim enzimatisus aktivitásával rendelkező protein az 1. - 14. számú szekvenciákban bemutatott peptid szekvenciák legalább néhányával rendelkezik.

3. Az 1. vagy a 2. igénypont szerinti DNS molekula azzal jellemezve, hogy a protein SDS gélelektroforézis alapján körülbelül 100 ± 10 kD molekulasúllyal rendelkezik.

4. Az 1. - 3. igénypontok bármelyike szerinti DNS molekula azzal jellemezve, hogy a molekula magasabbrendű növényekből származik.

5. A 4. igénypont szerinti DNS molekula azzal jellemezve, hogy a növény a *Solanaceae* családból származik.

6. Az 5. igénypont szerinti DNS molekula azzal jellemezve, hogy a növény a *Solanum tuberosum*-ot jelenti.

7. A 4. igénypont szerinti DNS molekula azzal jellemezve, hogy a növény a *Chenopodiaceae* családból származik.

8. A 7. igénypont szerinti DNS molekula azzal jellemezve, hogy a növény a *Spinacia oleracea*-t jelenti.

9. Egy vektor azzal jellemezve, hogy az 1. - 8. igénypontok bármelyike szerinti DNS molekulát tartalmazza.

10. A 9. igénypont szerinti vektor azzal jellemezve, hogy a vektorban a DNS molekula a prokarióta vagy eukarióta sejtekben történő transzkripciót és transzlációt lehetővé tevő szabályozó DNS szekvenciákhoz sense orientációban kapcsolódik.

11. Egy gazdasejt azzal jellemezve, hogy az 1. - 8. igénypontok bármelyike szerinti DNS molekulával, vagy a 9, vagy a 10. igénypontok bármelyike szerinti vektorral transzformáljuk, vagy mely sejt egy ilyen sejtől származik és az 1. - 8. igénypontok szerinti DNS molekulát vagy a 9. vagy a 10. igénypont szerinti vektort tartalmazza.

12. Növényi protein előállítására szolgáló eljárás azzal jellemezve, hogy a protein egy elágazást megszüntető enzim biológiai aktivitásával rendelkezik, vagy ennek egy aktív fragmentjével, a 11. igénypont szerinti gazdasejteket megfelelő

körülmények között tenyésztjük és a tenyészetből a proteint kinyerjük.

13. Egy elágazást megszüntető enzim biológiai aktivitásával rendelkező, vagy ennek egy biológiailag aktív fragmentjét tartalmazó protein azzal jellemezve, hogy:

(a) a 12. igénypont szerinti folyamattal kinyerhető; vagy

(b) melyet, a burgonyából vagy a spenótból származó proteineket nem számítva az 1. - 8 igénypontok bármelyike szerinti DNS molekula kódol.

14. A 11. igénypont szerinti gazdasejt azzal jellemezve, hogy egy transzgenikus növényi sejtet jelent.

15. Transzgenikus növények azzal jellemezve, hogy a 14. igénypont szerinti transzgenikus növényi sejteket tartalmaznak.

16. Keményítő azzal jellemezve, hogy a 14. igénypont szerinti növényi sejtekből vagy a 15. igénypont szerinti növényekből kinyerjük.

17. Egy transzgenikus növényi sejt azzal jellemezve, hogy elágazást megszüntető enzim aktivitását a nem-transzformált sejtekéhez képest az elágazást megszüntető enzimet kódoló endogén nukleinsav molekulák transzkripciójának vagy translációjának gátlása következtében csökkentjük, mely sejtek

(a) egy elágazást megszüntető enzimet kódoló endogén nukleinsav szekvencia transzkriptjéhez való antisense RNS-t kódoló rekombináns nukleinsav molekulát; vagy

(b) egy elágazást megszüntető enzimet kódoló endogén nukleinsav szekvencia transzkriptjének specifikus hasítására képes ribozimot kódoló rekombináns nukleinsav molekulát; vagy

(c) egy endogén elágazást megszüntető enzim gén expresszióját koszuppressziós hatással gátló RNS-t kódoló rekombináns nukleinsav molekulát

tartalmaz, és az említett csökkenés az említett rekombináns nukleinsav molekul expressziójából adódik.

18. Az 1. - 8. igénypontok bármelyike szerinti DNS molekulát, vagy egy ilyen molekula egy részét tartalmazó, a 17. igénypont szerinti transzgenikus növényi sejt azzal jellemezve, hogy a DNS molekula vagy annak egy része a növényi sejtekben a

transzkripciót lehetővé tevő szabályozó DNS szekvenciákhoz antisense orientációban kapcsolódik.

19. Transzgenikus növények azzal jellemezve, hogy a 17. vagy a 18. igénypontok szerinti növényi sejteket tartalmazzák.

20. Keményítő azzal jellemezve, hogy a 17. vagy a 18. igénypontok szerinti növényi sejtekből, vagy a 19. igénypont szerinti növényekből kinyerhetjük.

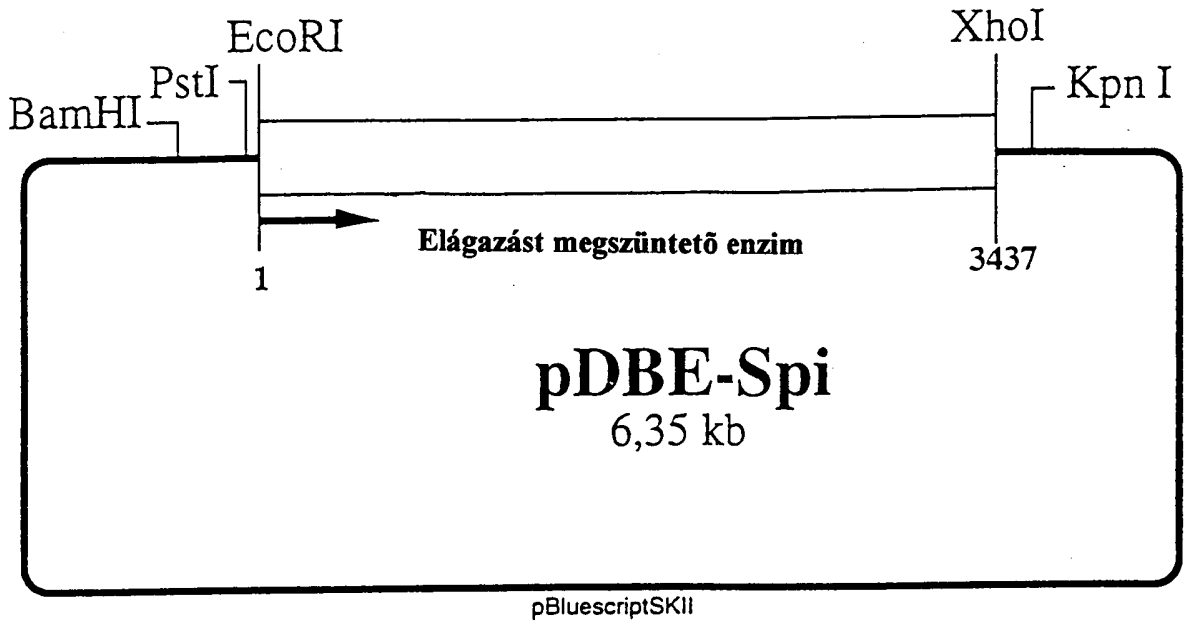
21. A 15. vagy 19. igénypont szerinti növények szaporító anyaga azzal jellemezve, hogy a 14. igénypont szerinti vagy a 17. vagy a 18. igénypontok bármelyike szerinti növényi sejteket tartalmaz.

22. A 16. vagy 20. igénypontok szerinti keményítő alkalmazása azzal jellemezve, hogy élelmiszeripari vagy egyéb ipari termékek előállítására használjuk.

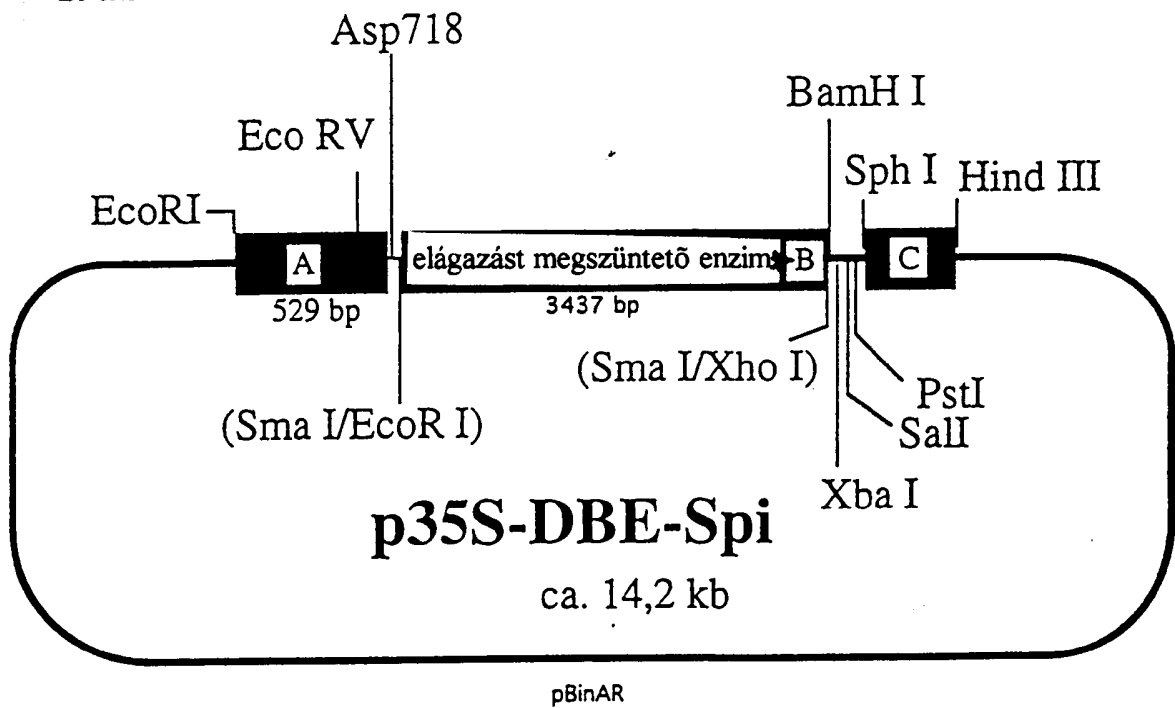


A meghatalmazott

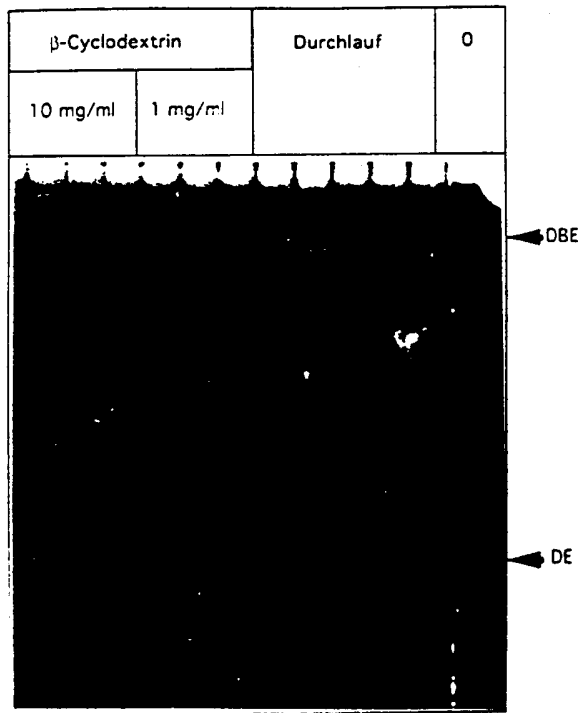
ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Nemzetközi
szabadalmiroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 143.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



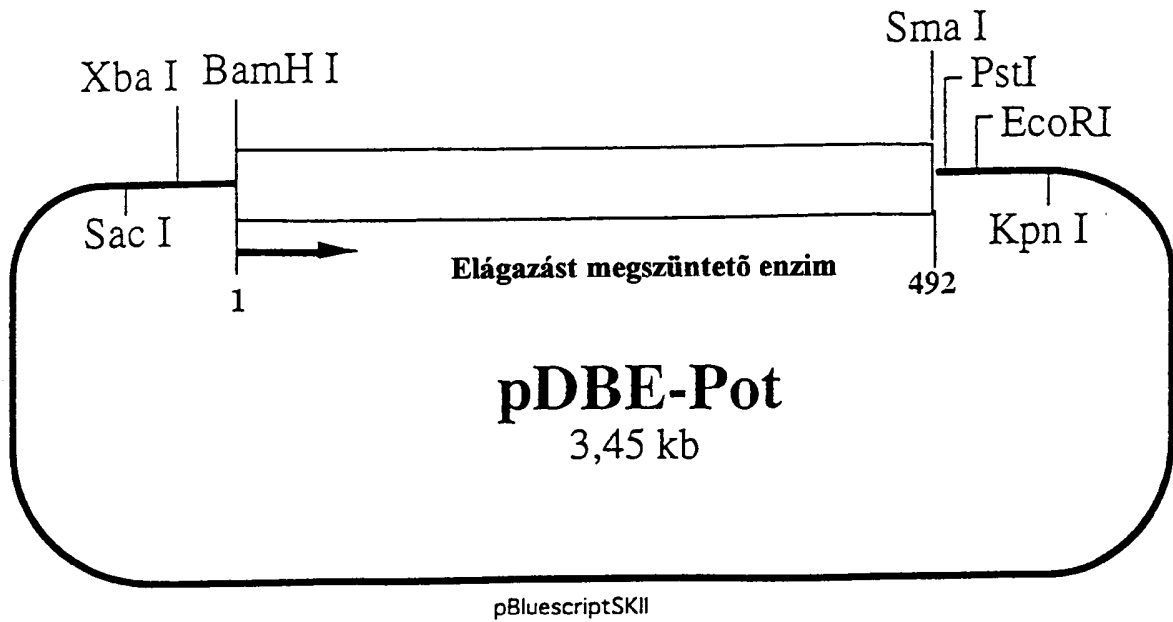
1. ábra



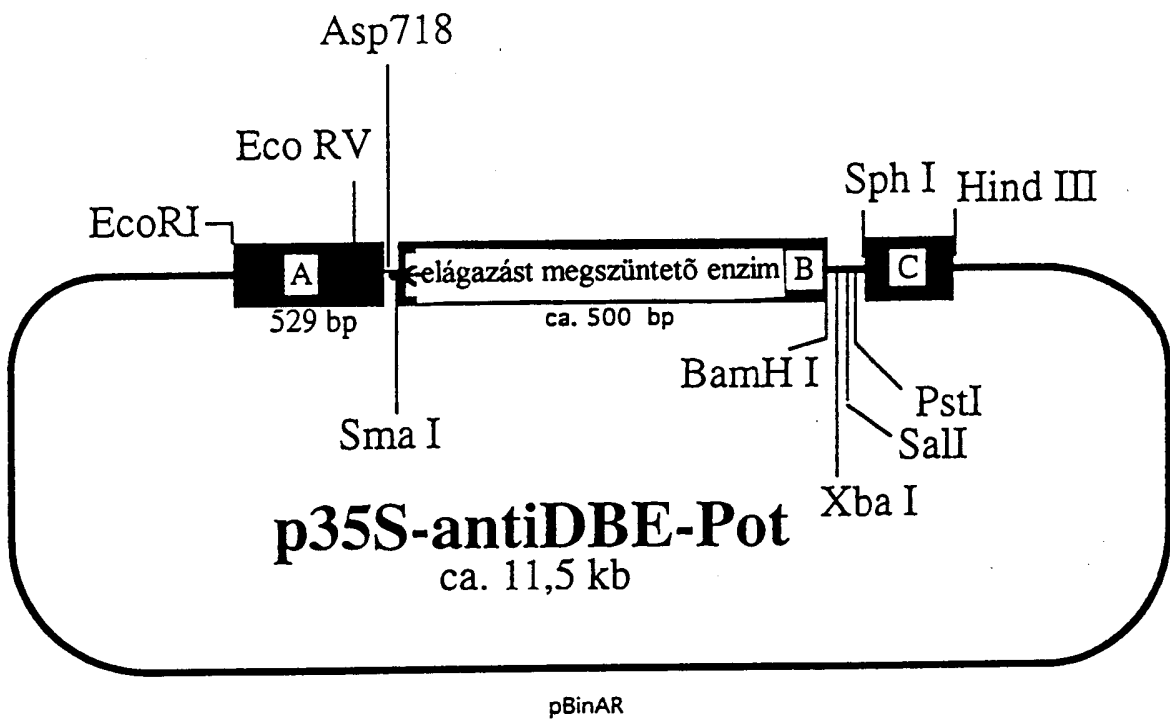
2. ábra



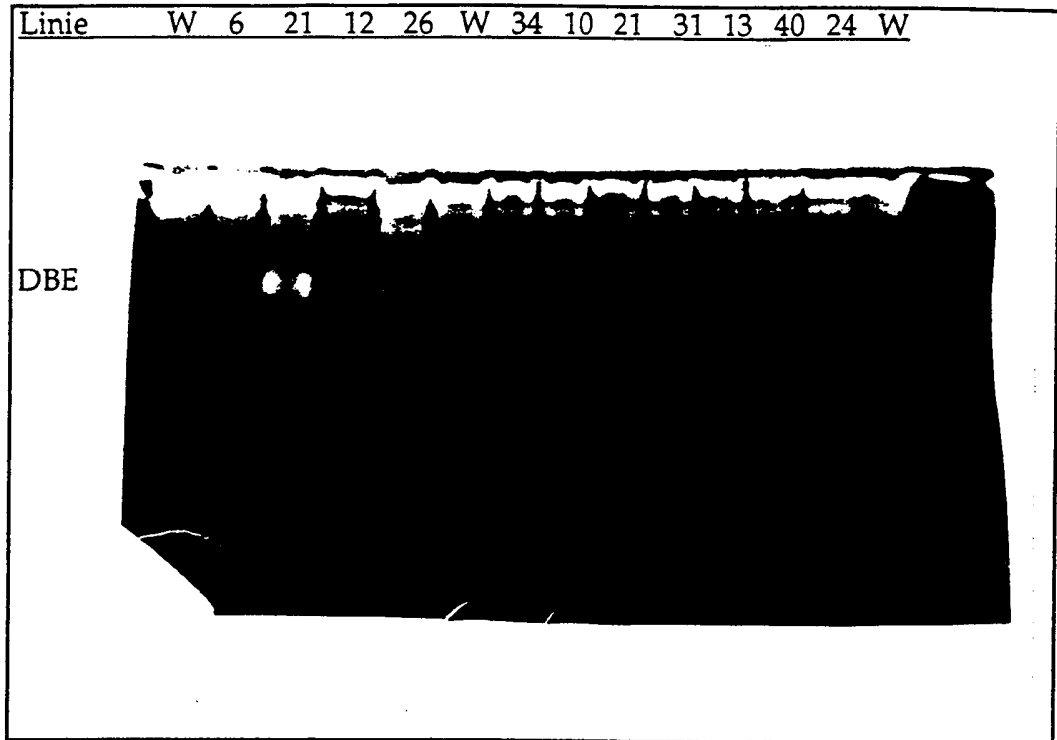
3. ábra



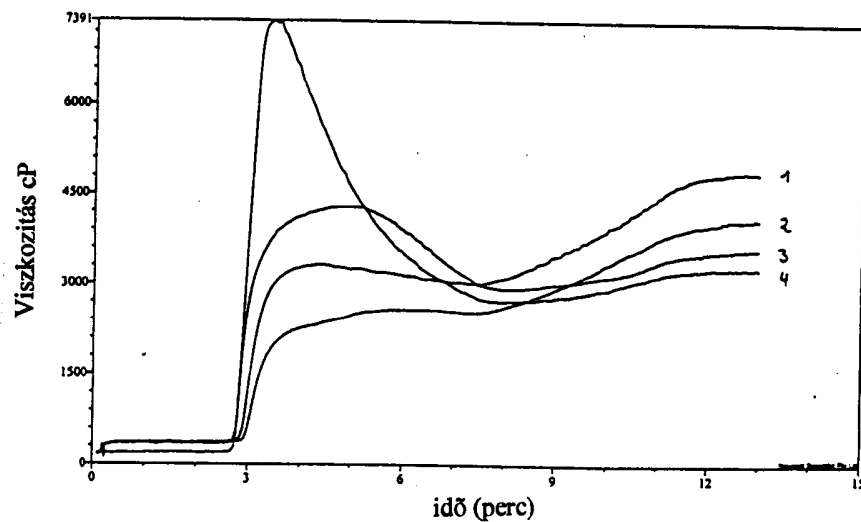
4. ábra



5. ábra

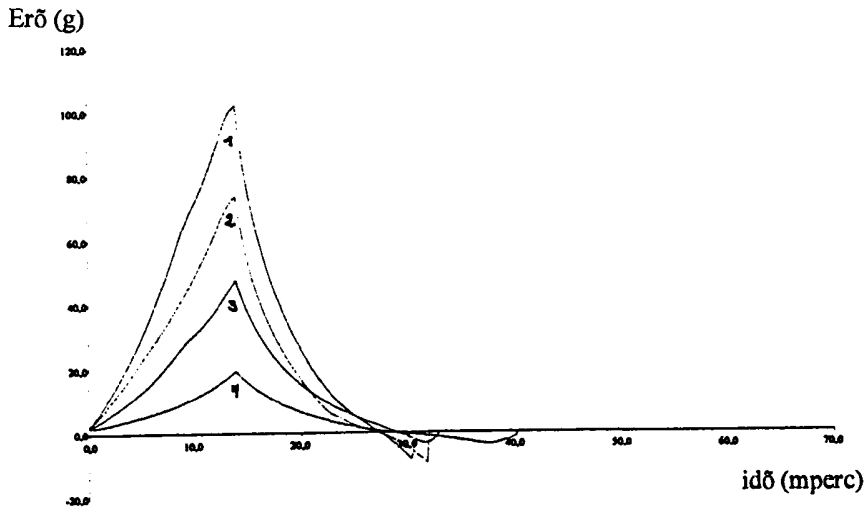


6. ábra



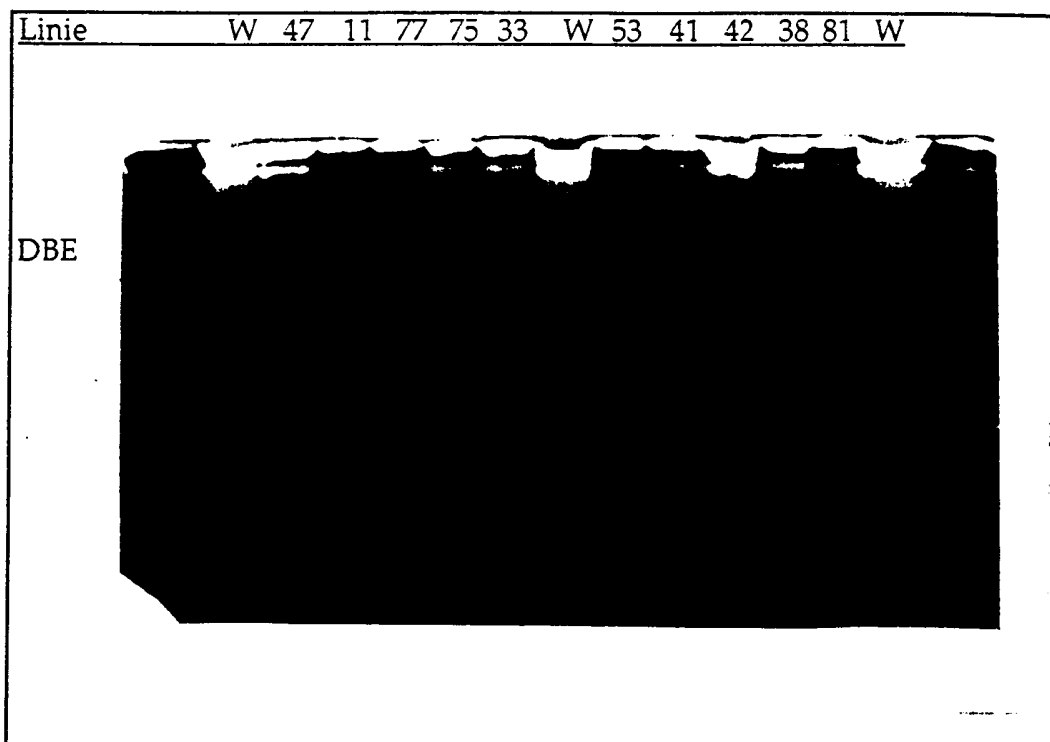
7. ábra

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

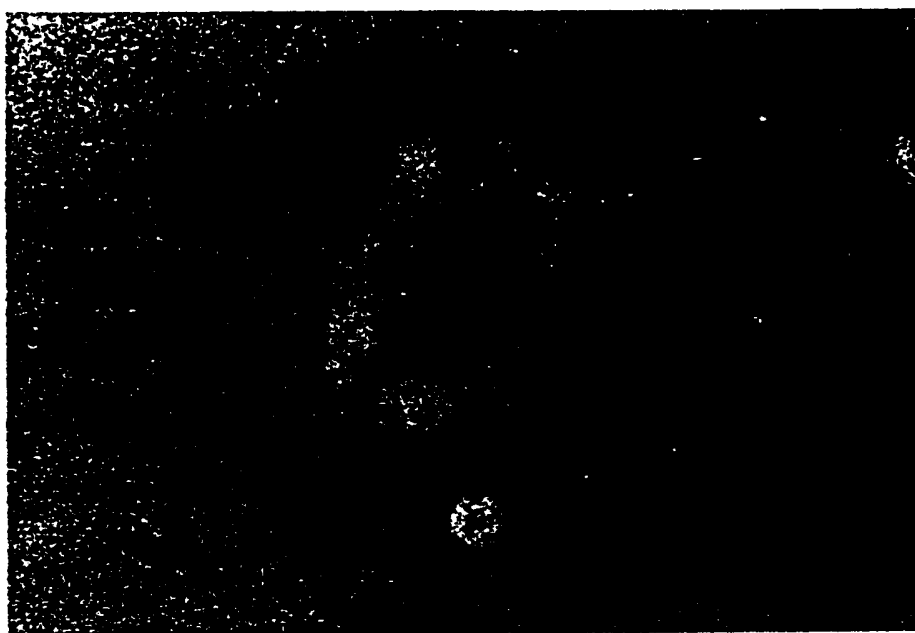


8. ábra

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

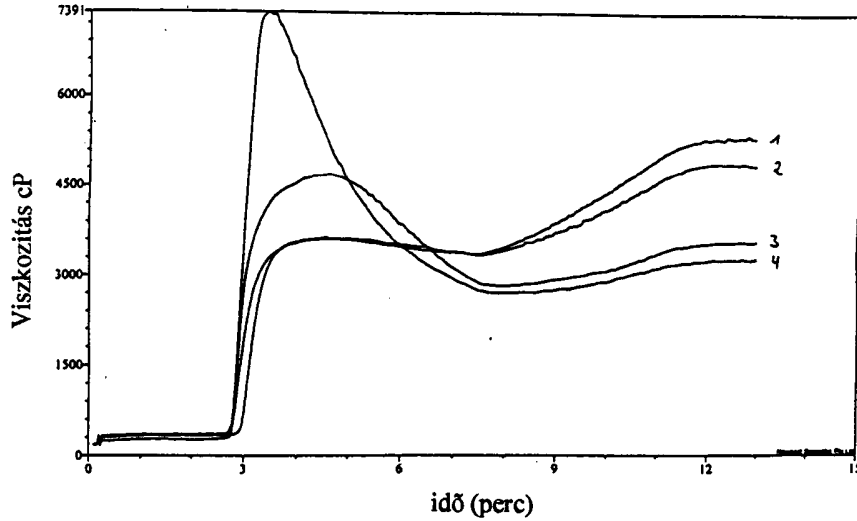


9. ábra

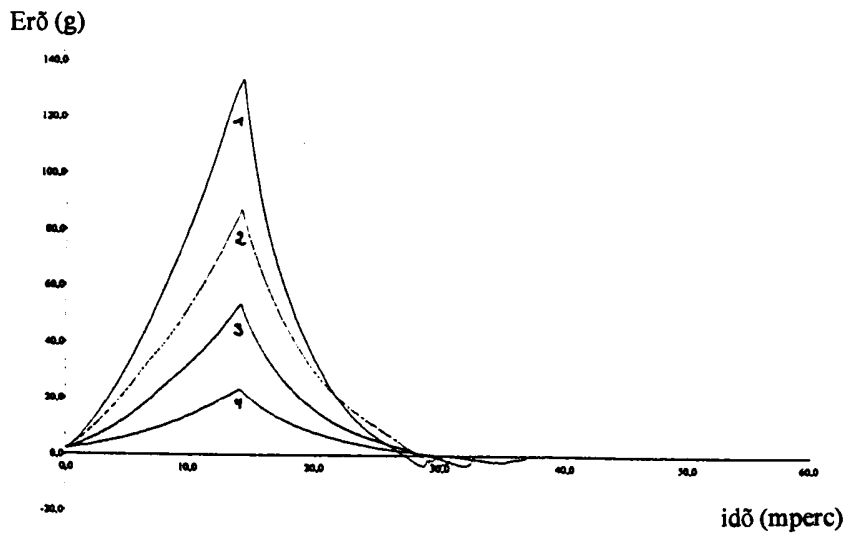


10. ábra

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



11. ábra



12. ábra