HU 0 0 0 0 2 1 6 5 3 6 B

(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

216 536 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 2545/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 05. 19.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/056,552 1987. 05. 29. US
07/056,506 1987. 05. 29. US
07/053,241 1987. 05. 22. US
07/052,440 1987. 05. 20. US

(51) Int. Cl.[6]

C 12 N 5/00
A 01 H 4/00

(40) A közzététel napja: 1990. 02. 28.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1999. 07. 28.

(72) Feltalálók:
Bowman, Cindy Grimmer, Cary, North Carolina (US)
Carozzi, Nadine, Raleigh, North Carolina (US)
Carswell, Gleta, Cary, North Carolina (US)
Chang, Yin-Fu, Hayward, Kalifornia (US)
Harms, Christian, Chapel Hill, North Carolina (US)
Lotstein, Richard, Durham, North Carolina (US)
Rice, Douglas, Durham, North Carolina (US)
Rothstein, Steven Jay, Chapel Hill, North Carolina (US)
Shillito, Raymond Douglas, Chapel Hill, North Carolina (US)

(73) Szabadalmas:
NOVARTIS AG., Bázel (CH)

(74) Képviselő:
S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54) Eljárás Zea mays sejtkomponensek, sejttenyészetek, ezekből regenerált, valamint transzgén Zea mays növények és rezisztens Zea mays növények előállítására

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás protoplasztokból vagy protoplaszt eredetű sejtekből regenerálható Zea mays növényeknek a regenerálására. A találmány továbbá vonatkozik embriogén sejttenyészetek és embriogén kalluszok előállításának módszerére. A találmány a fentieken túl vonatkozik genetikailag módosított protoplasztokból regenerált, genetikailag megváltozott Zea mays növények, előnyösen transzgén Zea mays növények előállítására. A találmány még további tárgya eljárás az osztódás vagy telepképzés fokozására növényi protoplasztokból. A találmány olyan kiméra gén előállítására is irányul, amely inszekticid hatást fejez ki kukorica- (Zea mays) sejtekben, ez az inszekticid hatás lényegében a Bacillus thüringiensis által termelt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival bír.

HU 216 536 B

A találmány tárgya eljárás protoplasztokból vagy protoplaszt eredetű sejtekből regenerálható Zea mays növényeknek a regenerálására. A találmány továbbá vonatkozik embriogén sejttenyészetek és embriogén kalluszok előállításának módszerére. A találmány a fentieken túl vonatkozik genetikailag módosított protoplasztokból regenerált, genetikailag megváltozott Zea mays növények, előnyösen transzgén Zea mays növények előállítására. A találmány még további tárgya eljárás az osztódás vagy telepképzés fokozására növényi protoplasztokból. A találmány olyan kiméra gén előállítására is irányul, amely inszekticid hatást fejez ki kukorica- (Zea mays) sejtekben, ez az inszekticid hatás lényegében a Bacillus thüringiensis által termelt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival bír.

A) Zea mays növények regenerálása protoplasztokból

A Zea mays kalluszból való regenerálásának leírása az 1970-es évek közepétől kelteződik [például Green és Phillips: Crop. Sc., *15*, 417–421 (1975); Harms és munkatársai: Z. Pflanzenzüchtg., *77*, 347–351 (1976); EPO 160,390 számú közzétett európai szabadalmi bejelentés (Lowe és Smith, 1985); EPO 176,162 számú közzétett európai szabadalmi bejelentés (Cheng, 1985); és EPO 177,738 számú közzétett európai szabadalmi bejelentés (Close, 1985)]. Kísérleteket végeztek több mint 12 éven át, hogy osztódást és ezt követő növényregenerálódást érjenek el a Zea mays protoplasztjaiból [Potrykus és munkatársai: a „Cell Genetics in Higher Plants" (Sejtgenetika magasabbrendű növényekben) című kiadványában (szerkesztők: Dudits és munkatársai, kiadó: Akadémiai Kiadó, Budapest, 1976), 129–140. oldal; és az ebben található irodalmi hivatkozások; Harms: „Maize and Cereal Protoplasts – Facts and Perspectives" (Kukorica- és gabonaprotoplasztok – tények és távlatok), a „Maize for Biological Research" (Kukorica a biológiai kutatásokhoz) című kiadványban (szerkesztő: Sheridan W. F., 1982); Dale: a „Protoplasts" című kiadványban (szerkesztők: Potrykus és munkatársai, 1983); Lecture Proceeding, Experienta Supplementum, *46* (szerkesztők: Potrykus és munkatársai, kiadó: Birkhauser, Bázel, 1983), 31–41. oldal, és az ebben található irodalmi hivatkozások]. A Zea mays protoplasztjai azonban mindig csak olyan tenyészetekhez vezettek, amelyek nem voltak képesek szaporodásra képes növények regenerálására [Potrykus és munkatársai: Mol. Gen. Genet., *156*, 347–350 (1977); Potrykus és munkatársai: Theor. Appl. Genet., *54*, 209–214 (1979); Choury és Zurawski: Theor. Appl. Genet., *59*, 341–344 (1981); Vasil: a „Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture" című kiadványban (szerkesztő: Fujiwara, Tokió, 1982), 101–104. oldal; Imbrie-Milligan és Hodges: Planta, *168*, 395–401 (1986); Vasil és Vasil: Theor. Appl. Genet., *73*, 793–798 (1987)]. Ezeknek az irodalmi hivatkozásoknak egyike sem nyújtja azonban olyan eljárás leírását, amely szaporodásra képes növények regenerálására képes protoplasztok előállítását mutatná be.

Ilyen protoplasztok előállításának képessége lehetővé tenné ennek a fontos terménynek a genetikai manipulációját például transzformálással vagy fúzióval, vagy lehetővé tenné a protoplasztok alkalmazását kiindulási anyagként értékes új fenotípusok kiválasztásához.

Bár a Zea mays genetikai transzformálása iránt igen nagy az érdeklődés, mindeddig még nincs leírás sikeres in vitro módszerről, amely regenerált, transzformált növényhez vezetne; bár vannak már leírások Zea mays protoplasztok olyan transzformálásáról, amely nem regenerálható kallusz kinyeréséhez vezet [Fromm és munkatársai: Nature, *319*, 791–793 (1986)].

Transzgén Zea mays növények előállítására egyik módszer lehetne, ha olyan utat találnánk, amelyben teljes, termő növények regenerálására képes protoplasztokat lehetne stabilan transzformálni. Nem jelent meg azonban leírás eddig olyan Zea mays protoplasztok előállításának módszeréről, amelyek képesek differenciálódáson keresztülmenve teljes, termő növénnyé alakulni.

Ezekkel és más tárgyakkal kapcsolatban értünk el eredményeket a jelen találmánnyal összhangban, feltalálva egy módszert olyan Zea mays protoplasztok előállítására, amelyek kallusztelepeket képezve tudnak osztódni. Ezek a protoplasztok transzformálhatók, és a kalluszok képesek termő Zea mays növényeket regenerálni. Az osztódni és kalluszt kialakítani képes Zea mays protoplasztok előállítási eljárása, amely protoplasztok azután indukálhatók teljes, termő növényekké való regenerálásra, speciális kallusztípust igényel. Ilyen kalluszokat, valamint az ezek előállítására és azonosítására szolgáló módszereket írunk majd le, ezeket a találmány egy részének tekintjük.

A speciális típusú kalluszt sejtszuszpenzió beindításához alkalmazzuk; ezt a szuszpenziót szintén a találmány részének tekintjük. Ezek a szuszpenziók az altenyésztés során olyan szuszpenziókhoz vezetnek, amelyeket protoplasztok izolálására lehet alkalmazni. Ezek a protoplasztok képesek osztódni és kalluszt képezni, amelyeket azután rá lehet bírni, hogy növényeket regeneráljanak. A sejtosztódást vagy kalluszképzést elő lehet segíteni bizonyos szerek jelenlétével, ilyenek például a (kis szénatomszámú)-alkanoil-szalicilsav (acetil-szalicilsav és homológjai), növényinövekedés-szabályozók vagy DMSO vagy mindezeknek a szereknek a kombinációi.

A növényregenerálás a protoplaszt eredetű, tenyészetben lévő Zea mays sejtekből lényeges a szomatikus hibridizálás alkalmazásához, a javított Zea mays változatok előállításához szomaklonális változaton keresztül, és genetikai manipulációk alkalmazásához új, fenotípusos jellemzőkkel rendelkező Zea mays növények, növényváltozatok, kultúrnövény-változatok vagy beltenyészetek előállítására.

B) Inszekticid tulajdonságú kukorica- (Zea mays) növények

A Bacillus thüringiensis (a továbbiakban Bt) olyan baktériumfaj, amely egy kristályos fehérjét termel, amelyet delta-endotoxinnak is neveznek. Ez a kristályos fehérje technikai szempontból protoxin, amely toxinná akkor alakul át, amikor pikkelyesszárnyú, fedelesszárnyú vagy kétszárnyú rovarok lárváinak emésztőrendszerébe jut.

A Bt-ből származó kristályos fehérje potenciálisan fontos inszekticid, mivel nincs ismert káros hatása em-

berre, emlősökre, madarakra vagy a pikkelyesszárnyú, fedelesszárnyú és kétszárnyú rovarok lárváitól eltérő rovarokra. A Bt toxin aktivitása rendkívül nagy, úgyhogy csak néhány nanogramm mennyiség szükséges ahhoz, hogy megölje a fogékony rovarlárvákat. A Bt-ből származó kristályos fehérje inszekticidként alkalmazásának további előnyei között találhatók a széles aktivitási spektrum pikkelyesszárnyú, fedelesszárnyú és kétszárnyú rovarlárvák ellen, és annak nyilvánvaló nehézsége, hogy ezek a lárvák ellenállást fejlesszenek ki a kristályos fehérje ellen, még akkor is, ha a kristályos fehérjét nagy mennyiségben alkalmazzuk. Az említett lárvák a mezőgazdaság és erdészet, de különösen a kukoricatermesztés fő problémái között vannak.

A kristályos fehérje inszekticidként hatásos, amikor a pikkelyesszárnyú, fedelesszárnyú és kétszárnyú lárvák fertőzésének kitett növényeknél alkalmazzuk.

Eddig a Bt kristályos fehérjét (protoxin) a Bacillusból izolálták, és a növényekhez standard módszerekkel, például beszórással vagy permetezéssel alkalmazták. Bt kristályos fehérjét tartalmazó készítményeket forgalmaznak és alkalmaznak biológiai inszekticidként. Ilyenek például a Bactospeine, amely a Biochem Products Ltd. terméke, a Dipel, amely az Abbot Laboratories terméke és a Thuricide, amely a Sandoz AG terméke. Az a tény, hogy a Bt csak spórázása folyamán termel kristályos fehérjét, határozott hátrányt jelent ennek a biológiai inszekticidnek a gyártásával és alkalmazásával kapcsolatban. Az ilyen növekedési fázisbeli korlátozás, különösen ipari léptékben, kényelmetlenséget és fölösleges időigényt okozhat a gyártás során. Ezenkívül az említett gyártás költségei nehézzé teszik, hogy az ilyen biológiai inszekticidek hatásosan versenyképesek legyenek más kémiai anyagokon, például piretroidszármazékokon alapuló, kereskedelmi forgalomban lévő termékekkel.

A Bt toxin alkalmazásával kapcsolatban további hátrány például az a tény, hogy a fehérje általában a kezelt növények felszínén marad, ahol az csak a felszínen táplálkozó lárvák ellen hatásos, és ahol ez a toxin inaktiválódik az ultraibolya sugárzásnak való kitettség miatt. Az inaktiválódás lehet legalább az egyik oka annak, hogy a kristályos fehérje nem marad meg a környezetben. Következésképpen a kristályos fehérje gyakori és drága alkalmazása szükséges.

Ezek és más hátrányok kiküszöbölhetők olyan módon, hogy Bt kristályos fehérjét vagy lényegében a Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival bíró fehérjét kódoló gént építünk be és fejezünk ki növényekben. A jelen találmány leírja, hogyan lehet ezeket a hátrányokat kiküszöbölni Bt kristályos fehérjét vagy lényegében a Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival bíró fehérjét kódoló gén beépítésével és kifejezésével kukoricaprotoplasztokban, és a termő transzgén kukoricanövények regenerálásával a transzformált protoplasztokból és ezeknek a rovarra rezisztens kukoricanövényeknek a tenyésztésével.

A genetikai manipulációk előnyeire támaszkodva egy hasznos polipeptid termeléséért felelős gént át lehet vinni egy donorsejtből, amelyben a gén természetes állapotban előfordul, valamely gazdasejtbe, amelyben a gén természetes állapotban nem fordul elő (Cohen és Boyer: 4,237,224 és 4,468,464 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások). Van azonban valójában néhány vele járó korlátja az ilyen átviteleknek. Géneket lehet átvinni vírusok, baktériumok, növények és állatok között. Bizonyos esetekben az átvitt gén funkcionális vagy funkcionálissá tehető a gazdasejtben. Amikor a gazdasejt növényi sejt, teljes növényeket lehet néha regenerálni a sejtből.

A gének tipikusan DNS-szekvenciák különböző területeit tartalmazzák, beleértve egy promotor és egy átírt (a továbbiakban: átíródó) területet. Az átírt terület normálisan tartalmaz egy 5'–le nem fordítódó területet, egy kódolószekvenciát és egy 3'–le nem fordítódó területet.

A promotor tartalmazza azt a DNS-szekvenciát, amely az átírás beindításához szükséges, amelynek során az átírt terület mRNS-sé alakul át. Az eukarióta sejtekben a promotorról úgy véljük, hogy magában foglal egy RNS-polimeráz által felismerhető területet és egy olyan területet, amely az RNS-polimerázt a DNS-en az átírás beindításához elhelyezi. Ez utóbbi területet TATA-doboznak (box) nevezzük, amely általában 30 nukleotiddal lefelé fordul elő az átírás beindításának helyétől.

A promotor területet követően van egy olyan szekvencia, amely átíródik mRNS-sé, de nem történik itt transzláció polipeptiddé. Ez a szekvencia alkotja az úgynevezett 5'–nem transzlatált területet, és úgy véljük, hogy ez tartalmaz olyan szekvenciákat, amelyek felelősek a transzláció beindításáért, ilyenek például a riboszómakötőhelyek.

A kódolóterület az a szekvencia, amely éppen az 5'–nem transzlatált területtől lefelé van a DNS-ben vagy a megfelelő RNS-ben. Ez az a kódolóterület, amely polipeptidekké transzlatálódik a genetikai kód szerint. A Bt például olyan kódolószekvenciával bíró génnel is rendelkezik, amely az inszekticid protoxin kristályos fehérje aminosavszekvenciájává transzlatálódik.

A kódolóterületet lefelé olyan szekvencia követi, amely mRNS-sé átíródik, de nem transzlatálódik polipeptiddé. Ezt a szekvenciát hívják 3'–nem transzlatált területnek, és úgy hisszük, hogy ez olyan szignált tartalmaz, amely az átírás befejezéséhez vezet, és eukarióta mRNS-ben olyan szignált, amely az átírt mRNS-szál poliadenilezését okozza. Az mRNS poliadenilezéséről úgy véljük, hogy feldolgozó és szállítási feladatai vannak.

Természetes géneket teljességükben át lehet vinni egy donorsejtből egy gazdasejtbe. Gyakran előnyös azonban olyan gént alkotni, amely a kívánt kódolóterületet tartalmazza olyan promotorral és kívánt esetben 5'– és 3'–nem transzlatált területekkel együtt, amelyek a természetben nem fordulnak elő ugyanabban a génben az adott kódolóterülettel együtt. Az ilyen konstrukciók kiméra génekként ismeretesek.

Genetikai manipulációs műveleteket már írtak le kristályos fehérje előállításának javított útjaihoz. Így például Schnepf és munkatársai (4,448,885 és 4,467,036 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szaba-

dalmi leírás) plazmidokat írnak le kristályos fehérjék termelésére Bt-től eltérő baktériumtörzsekben. Ezek a módszerek lehetővé teszik kristályos fehérje termelését, de nem ellensúlyozzák a kristályos fehérjének, mint kereskedelmi inszekticidnek alkalmazásával járó hátrányokat.

Voltak javaslatok arra is, hogy Bt toxint közvetlenül klónozzanak növényekbe abból a célból, hogy lehetővé tegyék: a növény megvédje saját magát [Klausner A.: Biotechnology, *2*, 409–413 (1984)]. Adang és munkatársai [EP–0,142,924 számú európai szabadalmi bejelentés (Agrigenetics)] és DeGreve H. M. J. és munkatársai [EP–0,193,259 számú európai szabadalmi bejelentés (Plant Genetic Systems N. V.)] módszert ismertetnek Bt-ből származó toxingének klónozására dohányban. Ezeknek a közleményeknek egyikében sincsen példa egyszikű növények transzformálására.

Szükség van új módszerek kifejlesztésére Bt kristályos fehérjék előállítására kukoricanövény sejtjeiben és néhány új módszerre olyan rovarlárvák megfékezésére, amelyek kukoricanövényen táplálkoznak, ahol ez a növény Bt kristályos fehérjét vagy hasonló polipeptidet tartalmaz, amely lényegében a Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival (inszekticid aktivitásával) rendelkezik. A „megfékezés"-t úgy értjük a továbbiakban, mint vagy a lárvák elpusztítását, vagy legalábbis táplálkozásuk visszaszorítását. Igény van továbbá módszerre kukoricanövény megvédéséhez olyan károk ellen, amelyet kártevők vagy patogének okoznak, a módszer abban áll, hogy olyan mennyiségű kártevőellenes (peszticid) vagy patogénellenes fehérje termelődik a növényi sejtben, illetve a növényben, amely mennyiség kielégítően hatásos a kártevők vagy patogének elpusztításához vagy megfékezéséhez. Ezenkívül előnyösen van igény módszerre kukoricanövény védelmére rovarok kártevése ellen, amely módszer abban áll, hogy inszekticidként hatásos mennyiségű Bt kristályos fehérje vagy lényegében Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkező fehérje termelődik a növényi sejtben. Ezeken túl igény van kukoricanövény védelmét szolgáló módszerre kémiai szerek károsító hatása ellen, például herbicidek ellen, abból a célból, hogy az ilyen kémiai anyagokat biztonsággal lehessen alkalmazni kukoricanövényekhez.

Ezeket a célokat és további célokat a jelen találmány szerint el lehet érni, amely találmány eljárást nyújt kukorica- (Zea mays) protoplasztok előállítására, amely protoplasztok sejteket és kallusztelepeket tudnak képezni. A protoplasztokat lehet, ha szükséges, transzformálni, és az így létrejövő sejtek és kalluszok képesek transzgén Zea mays növényekké regenerálódni. Az eljárás osztódni és kalluszt képezni képes protoplasztok előállításához, amelyek azután növényekké regenerálhatók, kiindulási anyagként új embriogén sejttenyészetet (szuszpenziós tenyészet vagy kallusztenyészet) igényel. Ilyen embriogén sejttenyészeteket és módszereket írunk le ezek előállítására és azonosítására, ezeket a találmány részének tekintjük. Az embriogén kalluszt, amelyből a szuszpenziók származnak, szintén alkalmazhatjuk kiindulási anyagként protoplasztokhoz. Az ilyen kalluszt, szuszpenziókat és embriókat, valamint az ezek előállítására és azonosítására szolgáló módszereket leírjuk, ezeket is a jelen találmány részének tekintjük.

Ezek az embriogén szuszpenziós tenyészetek képesek regenerálódni teljes, termő kukoricanövényekké, ezek a jelen találmány egyik előnyös tárgyát képviselik.

Ezek az embriogén tenyészetek olyan protoplasztok forrásai, amelyek képesek transzformálódni exogén DNS-sel, és osztódni, valamint kalluszt képezni, amely azután növényekké regenerálható, beleértve a teljes, termő Zea mays növényeket, amelyek talajban képesek nőni.

A jelen találmány továbbá olyan kiméra géneket szolgáltat, amelyek képesek kukoricasejtekben olyan polipeptidet kifejezni, amely lényegében Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival bír (ezután ezt kiméra Bt toxin génnek nevezzük).

A jelen találmány egy további kiviteli módja magában foglalja a kiméra Bt toxin gént vektorokban, baktériumokban, tenyészetben lévő növényi sejtekben és élő növényekben lévő növényi sejtekben, valamint magában foglal módszereket lényegében a Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkező toxin előállítására kukoricasejtekben, és módszereket rovarok megfékezésére vagy elpusztítására olyan módon, hogy ilyen toxint kifejező gént tartalmazó kukoricasejteket fogyasztanak el.

A jelen találmány továbbá módszert ír le egy polipeptidet kódoló gén bevezetésére és kifejezésére kukoricasejtekbe és növényekbe, amely azt a célt szolgálja, hogy a sejtek és növények tűrőképesek legyenek herbicid jellegű vegyi anyagokra.

A technika állásából nem volt előre látható abban az időben, amikor ezt a találmány szerinti eljárást megalkottuk, hogy kukorica- (Zea mays) növényeket, különösen termő kukoricanövényeket lehet regenerálni protoplasztból, protoplaszt eredetű sejtekből vagy protoplaszt eredetű kalluszokból. Még kevésbé volt előre látható, hogy a stabilan beépített exogén DNS-t tartalmazó Zea mays protoplasztok szintén regenerálhatók transzgén növényekké, főleg termőképes, transzgén Zea mays növényekké.

Az alábbiakban részletesebben ismertetjük a találmány tárgyait.

A találmány Zea mays növényekből származó embriogén sejttenyészetek (szuszpenziós tenyészetek vagy kallusztenyészetek) előállítására irányul, amely sejttenyészetekből protoplasztokat lehet izolálni, ahol a protoplasztok regenerálják a sejtfalat, osztódnak, és kalluszt képeznek, amely képes növénnyé regenerálódni, beleértve a termőképes Zea mays növényt is.

Ez a találmány foglalkozik Zea mays protoplasztokkal és az ezekből előállítható (a sejtfal regenerálódása után) protoplaszt eredetű növényi sejtekkel is, amelyek előnyösen termőképes növényekké regenerálhatók; az ilyen protoplasztok előnyösen sejttenyészetekből vagy embriogén sejtszuszpenzióból származnak.

Ez a találmány foglalkozik embriogén sejtszuszpenziós tenyészetekkel is, amelyeket termőképes kukoricanövényekké lehet regenerálni.

Ez a találmány foglalkozik protoplasztokból, transzformált vagy genetikailag más módon megváltoztatott protoplasztokból származó Zea mays növényi sejtekkel, kalluszokkal, embriogén szuszpenziókkal, embriókkal, csíranövényekkel és növényekkel.

Ezeken kívül a jelen találmány foglalkozik szaporítóanyagokkal és regenerált Zea mays utódokkal, amelyek embriogén sejtszuszpenziós tenyészetekből vagy tenyésztett protoplasztokból származnak. A szaporítóanyagok magukban foglalnak bármilyen anyagot, amelyet szexuálisan vagy aszexuálisan lehet szaporítani vagy in vitro lehet szaporítani. Ezek közül a szaporítóanyagok közül a protoplasztok, sejtek, kalluszok, szövetek vagy magok az előnyösek. Az említett regenerált Zea mays növények magukban foglalják ezek variánsait és mutánsait is. A mutánsok és variánsok magukban foglalják például azokat a növényeket, amelyeket sejtfúzióból vagy mutánsszelekcióból kapunk.

A jelen találmány előnyösen vonatkozik regenerált (protoplaszt eredetű) transzgén Zea mays növényekre és ezek szaporítóanyagaira, mindezek stabilan beépített exogén DNS-sel, előnyösen Zea maysban kifejezhető exogén DNS-sel, még előnyösebben olyan kiméra génnel rendelkeznek, amely a transzformált növénynek értékes tulajdonságokat biztosít. Az értékes tulajdonságokat a későbbiekben írjuk le.

Az említett transzgén Zea mays növény szaporítóanyagai magukban foglalnak bármely olyan anyagot, amely szexuálisan vagy aszexuálisan szaporítható vagy in vivo vagy in vitro szaporítható. Ezek között a szaporítóanyagok között az említett transzgén Zea mays növényekből protoplasztok, sejtek, kalluszok, szövetek vagy anyagok az előnyösek. A transzgén Zea mays növények utódai magukban foglalják ezek mutánsait és variánsait. A mutánsok és variánsok magukban foglalják például azokat a sejtfúzióból vagy mutánsszelekcióból kapott növényeket, amelyek még rendelkeznek a kiindulási anyag jellegzetes tulajdonságaival, amelyeket az exogén DNS előzetes transzformálása idézett elő.

A találmány foglalkozik Zea mays protoplasztok előállítási módszerével is, és olyan Zea mays növényi sejtek előállításának módszerével, amelyeket növénnyé, elsősorban termőképes növénnyé lehet regenerálni, ezenkívül foglalkozik az említett protoplasztokból vagy protoplaszt eredetű sejtekből származó és növényekké, főleg termőképes növényekké regenerálódni képes Zea mays kalluszok előállításának módszerével. Ezenkívül foglalkozik Zea mays növények és transzgén Zea mays növények regenerálásának módszerével ezekből a sejtekből (kallusz- vagy szuszpenziós sejttenyészet).

Ezeket a módszereket a későbbiekben részletesen leírjuk.

A jelen találmány egy további tárgya eljárást nyújtani Bt kristályos fehérje vagy olyan fehérje előállítására Zea mays sejtekben, amely lényegében a Bt kristályos fehérje rovar-toxicitásának tulajdonságaival rendelkezik. Különösen előnyös módszer lényegében a Bacillus thüringiensis kristályos fehérjéjének rovar-toxicitásával rendelkező polipeptid előállítására Zea maysban az alábbi módszer:

a) egy, lényegében a Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkező polipeptidet kódoló gént Zea mays sejtekbe vezetünk be, ahol a gén promotorja, 5'–nem transzlatált területe és kívánt esetben 3'–nem transzlatált területe növényi vagy növényivírus-génből származik, és

b) a polipeptidet kifejezzük.

A jelen találmány további tárgya eljárást nyújtani Zea mays növények védelmére olyan patogének által okozott károk ellen, amelyek megtámadják a Zea mays növényeket; az eljárás abban áll, hogy a növényi sejtben patogénellenesen hatásos mennyiségben vagy a patogén megfékezéséhez elegendő mennyiségben patogénellenes vagy patogénmegfékező aktivitással bíró fehérjét állítunk elő.

A jelen találmány további tárgya eljárást nyújtani Zea mays növények védelmére kártevők által okozott károk ellen; az eljárás abban áll, hogy a növényi sejtben peszticid hatáshoz elegendő mennyiségben vagy a kártevők megfékezéséhez elegendő mennyiségben peszticid- vagy kártevőmegfékező aktivitással bíró fehérjét állítunk elő. Különösen előnyös ez a módszer ott, ahol a kártevő valamely rovar.

A jelen találmány további tárgya eljárást nyújtani rovarlárvák, előnyösen fedelesszárnyú, pikkelyesszárnyú és kétszárnyú lárvák megfékezésére olyan módon, hogy ezek olyan kiméra géneket tartalmazó kukoricanövény sejtekkel táplálkoznak, amely gének inszekticid mennyiségű Bt kristályos toxint vagy lényegében a Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkező toxint fejeznek ki.

A jelen találmány további tárgya eljárást nyújtani kukoricanövények védelmére rovarkártevők ellen; az eljárás abban áll, hogy Bt kristályos fehérje vagy egy, lényegében a Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkező fehérje megfékező vagy inszekticid mennyiségét termeljük a növényi sejtben. Az inszekticid tulajdonságú kukoricanövény sejtek magukban foglalják a teljes növényből és a növény részeiből származó sejteket, valamint a tenyésztett kukoricasejteket.

A jelen találmány egy további tárgya olyan eljárást nyújtani, ahol a fehérje olyan mennyiségben termelődik, amely elegendő ahhoz, hogy a növényt a rovarok számára ellenszenvessé, nem vonzóvá tegyék, és így ezek abbahagyják a táplálkozást a növényen.

A jelen találmány egy további tárgya a fenti módszerekkel kapcsolatos géneket és más DNS-szegmenseket, valamint sejteket és növényeket szolgáltatni.

A jelen találmánynak ezek a tárgyai az itt következő részletes leírásból nyilvánvalóvá válnak.

Az alábbiakban ismertetjük az ábrák rövid leírását.

Az *1. ábra* olyan kalluszt mutat be, amely alkalmas Zea mays embriogén szuszpenzióinak beindítására (mintegy hétszeres nagyítás) [(a) lépés].

A *2. és 3. ábra* sűrűn citoplazmás, osztódó sejteket mutat be, amelyek a (b)–(d) lépések tenyészeteiben visszamaradnak (mintegy 20-szoros nagyítás).

A *4. ábra* szilárd tápközegen tenyésztett protoplasztokból kifejlődő kalluszokat mutat be (mintegy hétszeres nagyítás).

Az *5. ábra* az (f) lépés szerinti, protoplasztokból származó kalluszt mutat be (mintegy hétszeres nagyítás).

A *6. ábra* a kallusz további differenciálódását mutatja be, a (g) pont szerint csíranövényt képezve.

A *7. ábra* a KM tápközegre szélesztett Zea mays protoplasztokból származó telepeket mutatja be 2,4-D-vel és acetil-szalicilsavval és ezek nélkül. Balra fent: 2,4-D vagy acetil-szalicilsav nélkül. Jobbra fent: 1 mg/liter 2,4-D, de acetil-szalicilsav nélkül. Balra lent: 100 mg/liter acetil-szalicilsav, de 2,4-D nélkül. Jobbra lent: 100 mg/liter acetil-szalicilsav és 1 mg/liter 2,4-D.

A *7a ábra* mutatja be a pCIB5 megalkotását.

A *7b ábra* mutatja be a pCIB4 megalkotását.

A *7c ábra* mutatja be a pCIB2 megalkotását.

A *7d ábra* mutatja be a pRK252Km megalkotását.

A *7e ábra* mutatja be a pCIB10 megalkotását.

A *7f ábra* mutatja be a pRK290Km megalkotását.

A *7g ábra* mutatja be a pCIB10a megalkotását

A *8. ábra* mutatja be a Zea mays protoplaszt eredetű kalluszából regenerált csíranövényt.

A *9. ábra* mutatja be a protoplaszt eredetű kalluszból regenerált Zea mays növényt.

A *10. ábra* mutatja be a pCIB710 plazmid megalkotását.

A *11. ábra* mutatja be a pCIB10/710 plazmid megalkotását.

A *12. ábra* mutatja be a pCIB10/35SBt megalkotását.

A *13–18. ábra* mutatja be a Bacillus thüringiensis var. kurstaki HD1-ből származó endotoxin gén nukleotidszekvenciáját.

Előnyös nukleotidszekvencia a kristályos fehérjét kódolók közül az, amelyet a szekvenciában a 156–3623. nukleotidok között mutatunk be vagy olyan rövidebb szekvencia, amely egy ilyen kristályos fehérje inszekticid fragmentumát kódolja [Geiser és munkatársai: Gene, *48*, 109–118 (1986)].

A *19. ábra* Zea mays protoplasztoknak pCIB712-vel végzett transzformálása után kinyert különböző Zea mays kalluszainak Southern-foltelemzését mutatja be, a vizsgálatot pCIB712 EcoRI fragmentumával végezve.

1–4 csíkok: pCIB712 genomrekonstrukciónként 0,5, 1,2 és 5 kópia, EcoRI restrikciós endonukleázzal hasítva.

5–25. csíkok: pCIB712 protoplasztokkal végzett transzformáció után nyert Zea mays kallusztenyészetből kapott DNS, EcoRI restrikciós endonukleázzal hasítva.

A DNS a 10. csíkban világosan mutatja idegen DNS jelenlétét a Zea mays sejtek genomjába integrálva, amelyet a film sötétedése igazol. A nyíl a 975 bp-s fragmentumra mutat, amely a pCIB712 integrált APH IV génjének EcoRI emésztéséből várható, ez viszi át a higromicin rezisztenciát a transzgén sejtekbe.

A *20. ábra* a pCIB10/35SBt(KpnI) megalkotását mutatja be.

A *21. ábra* a pCIB10/35SBt(BclI) megalkotását mutatja be.

A *22. ábra* a pCIB10/35SBt(607) megalkotását mutatja be.

Az alábbiakban a bejelentésben szereplő definíciókat határozzuk meg.

„Rutineljárások”: Caruthers, M. H.: Gene Synthesis Machines. DNS Chemistry and Its Uses. Science 230, 281–285, 1985.

Zea mays/kukorica. A jelen leíráson és igénypontokon keresztül ez a kifejezés bármely növényre vagy növényrészre vonatkozik (protoplasztok, sejtek, szövetek, szervek, organellumok, embriók, kalluszok, szaporítóanyagok stb.), amely a Zea mays fajhoz tartozik. A kifejezés, ahogyan itt alkalmazzuk, magában foglalja a Zea mays fajtáit, kultúrnövény-változatait, egyéb változatait, tenyésztési vonalait és hibridjeit. A jelen találmány magában foglalja (de nemcsak ezekre korlátozódik) a kukoricatenyésztési vonalakat, mint például a Funk 5N984, Funk 5N986, Funk 2717, Funk 211D, Funk 2N217A, B73, A632, CM105, B37, B84, B14, Mo17, R168, MS71, A188, FA91, A641 és W117 vonalakat. Előnyös az összes elit genotípus (változatok, kultúrnövény-változatok, tenyésztési vonalak, hibridek stb.), beleértve a Funk 5N984, Funk 5N986, Funk 2717, Funk 211D és Funk 2N217A, legelőnyösebben a Funk 2717 elit tenyésztési vonalakat.

DMSO: dimetil-szulfoxid.

BMS. „Black Mexican Sweet Corn” (fekete mexikói édes kukorica). Régi, kis csövű, édes kukoricaváltozat a kukoricaszem magburkának sötétkék elszíneződésével, a magnak „fekete” megjelenést adva.

Növényi sejt. Növények szerkezeti és fiziológiai egysége, amely protoplasztból és sejtfalból áll.

A „növényi sejt” bármilyen sejtre vonatkozik, amely vagy egy növény része, vagy egy növényből származik. A jelen találmány által körülölelt sejtekre adható példák magukban foglalják a differenciált sejteket, amelyek egy élő növény részei, differenciált sejteket tenyészetben, nem differenciált sejteket tenyészetben, nem differenciált szöveteket, mint például kallusz vagy tumorok sejtjei, magokat, embriókat, szaporítóanyagokat és pollent.

Növényi szövet. Szerkezeti és funkcionális egységbe szervezett növényi sejtek csoportja. Egy növény bármely szövete az élő növényben vagy tenyészetben. Ez a kifejezés magában foglalja (de nem ezekre korlátozódik) a növényi sejteket, növényi szerveket, növényi protoplasztokat sejttenyészetben és szerkezeti és/vagy funkcionális egységekbe szervezett növényi sejtek bármilyen csoportját. Ennek a kifejezésnek alkalmazása egy speciális típusú növényi szövettel (lásd az előbbi felsorolást) együtt vagy anélkül, amint ezt fentebb felsoroltuk, vagy ezzel a definícióval egyébként behatároltunk, nem tekinthető kizárónak bármilyen más típusú növényi szövet tekintetében.

Növényi szerv. Valamely növény elkülönült és láthatóan adott célra szerkesztett és diferenciált része, például gyökér, szár, levél, virág, rügy vagy embrió. Egy növényi szerv különböző típusú növényi sejtekből vagy növényi szövetekből állhat.

Protoplaszt. Izolált növényi sejt sejtfal nélkül.

Transzgén növény. Növény, amely stabilan beépített exogén DNS-sel rendelkezik genetikai anyagában.

Exogén DNS. Az oxogén DNS kifejezés magában foglalja az exogén DNS-t, amelyet be lehet vezetni a protoplasztokba különböző formákban, beleértve például a csupasz DNS-t kör alakú, lineáris vagy szupertekercselt formában; a nukleoszómákban, kromoszómákban vagy sejtmagokban vagy ezek részeiben lévő DNS-t; más molekulákkal társult vagy komplexet alkotó DNS-t; liposzómákba, szferoplasztokba, sejtekbe vagy protoplasztokba zárt DNS-t. Sokféle, különböző módszer ismeretes az exogén DNS protoplasztokba való bevezetésére a szakterületen, és ezeket alkalmazni lehet a jelen találmány szerinti transzgén protoplasztok, transzgén sejtek vagy transzgén növények előállítására.

Tenyészet. Sejtek burjánzó tömege nem differenciált vagy részben differenciált állapotban. A „sejttenyészet" kifejezés magában foglalja a kallusztenyészeteket, amelyek megszilárdított tenyésztő közegen növekvő sejttömegből állnak, és a szuszpenziós tenyészet sejtjeit, amelyek diszpergált állapotban nőnek egy rázott, folyékony tenyésztőközegben.

Embrió. Valamely növény parányi, korai fejlődési stádiuma, amely vagy egy zigótából származik (amelyet azután szexuális embriónak hívunk), vagy egy embriogén szomatikus sejtből származik (amelyet ezután szomatikus embriónak hívunk), felismerhető morfológiai, szerkezeti és celluláris szervezettség stádiumában, amely a celluláristól globulárisig terjed, a sziklevél stádiumáig. [A kukoricaembrió fejlődését leírja például Randalph L. F.: J. Agric. Research, *53*, 881–916 (1936); a fűembrió fejlődését általában leírja például Brown W. V.: Phytomorphology, *10*, 215–223 (1960)].

Csíranövény. Többsejtes szerkezet hajtásból és gyökérből felépítve, kis növény formájában.

Kiméra szekvencia vagy kiméra gén. Legalább két heterológ részt tartalmazó DNS-szekvencia, például korábbi állapotban létező DNS-ből származó vagy lényegében korábbi állapotban létező DNS-sel szekvenciahomológiát mutató részek, amelyek korábbi állapotukban nem voltak összekapcsolva. A korábbi állapotban létező DNS-szekvenciák lehetnek természetes vagy szintetikus eredetűek.

Kódoló DNS-szekvencia. DNS-szekvencia, amely amikor átíródik és transzlatálódik, celluláris polipeptid képződését eredményezi.

Gén. Elkülönült kromoszomális terület, amely tartalmaz egy, a kifejeződés, vagyis az átírás és transzláció szabályozásáért felelős szabályozó (regulátor) DNS-szekvenciát és egy kódolószekvenciát, amely átíródik és transzlatálódik, így adva egy elkülönült polipeptidet.

Származik valahonnan. A jelen bejelentés szövegösszefüggésében más DNS-forrásokból „származó" gének, gének tömbjei vagy más DNS-szekvenciák magukban foglalják azokat a géneket, génrészeket vagy más DNS-szekvenciákat is, amelyek lényegében homológok azzal.

Fenotípusos jellemző. Egy vagy több gén kifejeződésének eredményeként létrejött, megfigyelhető tulajdonság.

Korábbi állapotban létező DNS-szekvencia. DNS-szekvencia, amely egy, a jelen találmány szerinti termékben vagy módszerben való felhasználása előtt már létezett, teljességében vagy részben. Bár a korábbi állapotban létezés tipikusan természetes eredetet tükröz, a korábbi állapotban létező szekvenciák lehetnek szintetikus vagy más eredetűek is.

Lényegi szekvenciahomológia. Lényegi funkcionális és/vagy szerkezeti ekvivalencia nukleotid- vagy aminosavszekvenciák között. A lényegi szekvenciahomológiával bíró szekvenciák közötti funkcionális és/vagy szerkezeti különbségeknek minimálisnak kell lenniük.

Chlorox: US 4,863,633 (Chlorox Co., Oakland, CA 94612)

Dicamba: 3,6-diklór-2-metoxi-benzoesav

MES: 2-(N-morfolino)-etánszulfonsav

2,4-D: 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav

Picloram: 4-amino-3,6,6-triklór-pikolinsav

Tris-HCl: alfa-alfa,alfa-trisz(hidroxi-metil)-metil-amin-hidroklorid

EDTA: 1-etilén-diamin-N,N,N',N'-tetraecetsav

PEG: polietilénglikol

Phytagar: Gibco Labs. Inc., Grand Island, NY

Agaróz. Az agaróz készítését és tisztítását például Guiseley és Renn írják le ["The Agarose Monograph", Marine Colloids Division FMC Corp. (1975)]. Az agaróz az agar alkotórészeinek egyike. A kereskedelmi forgalomban kapható agar normálisan semleges agaróz és ionos, nagyszámú oldalcsoporttal bíró agaropektin keveréke. A kereskedelmi forgalomban kapható agarózt normálisan agarból kapják hagyományos módszerekkel. Általában bizonyos számú oldallánc érintetlen marad, és ez meghatározza az agaróz fizikokémiai tulajdonságait, például a gélképzést és olvadási hőmérsékletet. Az alacsony olvadáspontú agaróz, főleg a SeaPlaque^R agaróz az előnyös szilárdító anyag a későbbiekben leírt folyamatokban.

Rhozyme: Rhozyme HP150, Interspex Products Inc., CA 94404.

SH-tápközeg. Schenk R. U. és munkatársai tápközege [Can. J. Bot., *50*, 199–204 (1972)], növekedési szabályozók nélkül. [Az SH-tápközeg lehet folyadék vagy lehet szilárdítva 0,8% (tömeg/térfogat) agarral vagy 0,5% (tömeg/térfogat) GelRite^R-vel]. A tápközeget normális módon sterilezzük a szakterületen ismert módszerekkel, például hővel vagy autoklávozással sterilezve 121 °C hőmérsékleten körülbelül $1{,}2 \cdot 10^5$ Pa nyomáson 15–20 percen át.

MS-tápközeg. Murishage T. és Skoog F.: Physiol. Plant, *15*, 473 (1962).

BS-tápközeg. Gamborg O. és munkatársai: Exp. Cell. Res., *50*, 151 (1968).

N6-tápközeg. Chu és munkatársai: Scientia Sinica, *18*, 659 (1975).

Az összetételt az alábbi 1. táblázatban adjuk meg.

Agrobacteriummal végzett transzformáció B5-közeg (Gamborg et al., 1968)

Komponens	Koncentráció (mg/l)
Makrotápanyagok	
KNO_3	3000,000
$(NH_4)_2SO_4$	134,000

Komponens	Koncentráció (mg/l)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	500,000
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	150,000
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	150,000
Sequestrene 330 Fe	28,000
$MnSO_4 \cdot H_2O$	10,000
Mikrotápanyagok	
KI	0,750
H_3BO_3	3,000
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2,000
$CuSO_4$	0,025
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,250
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
Mioinozit	100,000
Tiamin-HCl	10,000
Nikotinsav	1,000
Piridoxin-HCl	1,000
Szacharóz	20 000,000
pH 5,5	

Az előbbi komponensek, a szacharóz kivételével, kiszerelt csomagolásban a Flow Laboratories Ltd.-től szerezhetők be.

Hoagland-féle oldat

Törzsoldat	Komponens	Koncentráció (g/l)	Törzsoldat térfogat ml/liter kész táptalaj
Makrotápanyagok			
A	KNO_3	101,100	6,0
B	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,160	4,0
C	$NH_4H_3PO_4$	115,080	2,0
D	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,490	1,0

pGY1 plazmid. Ez a plazmid a Pietrzak et al. által leírt (Nucl. Acid Res., 14, p. 5857–5868, 1986) pDH51 növényi expressziós vektorból származik. A pGY1 plazmidban a kiindulási pDH51 plazmid NcoI hasítási helyét egy XhoI hasítási hellyel helyettesítettük. Ez úgy érhető el, hogy a pDH1 plazmidot NcoI-lal hasítjuk, és Klenow-polimeráz alkalmazásával töltjük be a kinyúló végeket, amelyek következésképpen tompává válnak. Ezután egy XhoI linkerrel (CCTCGAGG) ligálunk.

Protoplasztból származó sejtek vagy protoplasztból származó kalluszok. A leírásból és a példákból kitűnően egy ilyen sejtet a növényi sejtfal regenerálásával állítunk elő (lásd a 4. oldal utolsó előtti bekezdését), a kalluszt pedig oly módon, hogy a kapott regenerált növényi sejtet tovább tenyésztjük.

Protoxingén. Ennek a génnek az elkülönítését a Bac. thüringiensis kurstaki HD–1 törzsből a 238 441 számú európai szabadalmi leírás írja le. A törzs a Budapesti Szerződés szerint a DSM-ben (Braunschweig, NSZK) történt letétbe helyezés után a DSM 3667 számon szerezhető be.

KM-tápközeg. Kao K. N. és munkatársai: Planta, *126*, 105–110 (1975). Ez a tápközeg lehet folyékony vagy lehet szilárdítva agarral, agarózzal vagy GelRite^R-vel, és lehet készíteni és alkalmazni aszkorbinsav, D-vitamin és A-vitamin nélkül is. A tápközeg alkotórészeket, a szilárdító anyagok kivételével, normálisan szűréssel sterilezzük 0,2 μm-es szűrőn keresztül. Az összetételt az alábbi, 1. táblázatban adjuk meg.

1. táblázat

Az alkalmazott tápközegek összetétele[a]

A tápközegek makroelemei és mikroelemei az irodalomban megadottak

Tápközeg	KM[b,c,d]	N6
A tenyésztő tápközegben alkalmazott vitaminok, mg/l[e]		
Biotin	0,1	
Piridoxin.HCl	1,00	0,5
Tiamin.HCl	10,00	0,1
Nikotinamid	1,00	
Nikotinsav	0,10	0,5
Folsav	0,40	
D-Ca-pantotenát	1,00	
p-Amino-benzoesav	0,02	
Kolin-klorid	1,00	
Riboflavin	0,20	
B_{12}-vitamin	0,02	
Glicin	0,10	2,0
Cukrok és cukoralkoholok, g/liter		
Szacharóz	0,25	30,0
Glükóz	68,40	
Mannit	0,25	
Szorbit	0,25	
Cellobióz	0,25	
Fruktóz	0,25	
Mannóz	0,25	
Ramnóz	0,25	
Ribóz	0,25	
Xilóz	0,25	
m-Inozit	0,10	
Végső pH	5,8	5,6

Lábjegyzetek:

a) A makroelemeket általában tízszeresen koncentrált törzsoldatként készítjük, és a mikroelemeket 1000-szeresen koncentrált törzsoldatként.

b) A citromsavat, fumársavat és almasavat (mindegyiket 40 mg/liter végső koncentrációban) és a nátrium-

piruvátot (20 mg/liter végső koncentrációban) 100-szorosan koncentrált törzsoldatban készítjük, a pH-t NH_4OH-val 6,5-re állítjuk be, és így adjuk a tápközegbe.

c) Az adenint (0,1 mg/liter végső koncentrációban) és a guanint, timint, uracilt, hipoxantint és citozint (mindegyiket 0,03 mg/liter végső koncentrációban) 1000-szeresen koncentrált törzsoldatként készítjük el, a pH-ját a fentiekhez hasonlóan 6,5-re állítjuk be, és így adjuk a tápközeghez.

d) Az alábbi aminosavakat adjuk ehhez a tápközeghez, tízszeres töménységű törzsoldatot alkalmazva (pH 6,5, NH_4OH-val beállítva), hogy az alább megadott végső koncentrációt kapjuk meg: glutamin (5,6 mg/liter), alanin, glutaminsav (0,6-0,6 mg/liter), cisztein (0,2 mg/liter), aszparagin, aszparaginsav, cisztein, hisztidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenil-alanin, prolin, szerin, treonin, triptofán, tirozin és valin (0,1-0,1 mg/liter).

e) Vitamintörzsoldat, normálisan 100-szorosan koncentrált formában készítve.

Celluláz RS. Cellulase RS, Yakult Honsha Ltd., 1.1.19, Higashi-Shinibashi, Minato-Ku, Tokio 105, Japán.

Pektoliáz Y–23. Pectolyase Y–23, Seishin Pharmaceutical Co. Ltd., 4–13 Koami-cho, Nihonbashi, Tokio, Japán.

Nalgen-szűrő. Nalgene^R, Nalge Co., Division of Sybron Corp., Rochester, New York, 14602, Amerikai Egyesült Államok.

BglII. BglII restrikciós enzim; New England Biolabs, 32 Tozer Road, Beverly, MA, 01915, Amerikai Egyesült Államok vagy bármely más kereskedelmi szállító.

BamHI. BamHI restrikciós enzim; New England Biolabs, 32 Tozer Road, Beverly, MA, 01915, Amerikai Egyesült Államok vagy bármely más kereskedelmi szállító.

Higromicin B. Citotoxin: tisztított higromicin B, Calbiochem Behring Diagnostica, 400050 katalógusszám, La Jolla, CA 92037, Amerikai Egyesült Államok, 702296 tételszám.

GelRite^R. GelRite Gellan Gum, Scott Laboratories, Inc. Fiskerville, RI 02823.

PRIME TIME véletlenszerű primer készlet vagy IBI véletlenszerű primer készlet: International Biotechnologies Inc., PO BOX 1565, New Haven, CT 07606, Amerikai Egyesült Államok (katalógusszám: 77800, tételszám: F630-01).

GA7^R tartály. Kis, steril tartály (mintegy 7×7×10 cm), áttetsző műanyagból áttetsző fedővel; csíranövények, kihajtó tenyészetek stb. növesztésére alkalmazható. Szállító: Magenta Corp. 3800 N. Milwaukee Avenue, Chicago, IL, 60641, Amerikai Egyesült Államok. Helyettesíthető bármilyen más steril, áttetsző tartállyal (például üveg- vagy műanyag tartállyal).

Mikroeinstein átszámítása luxra

E	lux
0,1–200	8–16 700
0,1–100	8–8350
30– 90	2500–7500
10– 40	830–3330
30– 80	2500–6670

Plazmidok deponálása mikroorganizmusokban vagy növényi sejtek deponálása

A jelen találmánnyal kapcsolatban az alább felsorolt plazmidokat (mikroorganizmusokban) és növényi sejteket helyeztük letétbe a Budapesti Szerződés követelményei szerint.

E. coli HB101: DSM 1607 (Braunschweig, NSZK).

(1) 6-2717 CG Zea mays szuszpenziós sejttenyészet, Funk 2717-ből, amely az American Type Culture Collectionnál (ATCC) van letétbe helyezve (Rockville, Amerikai Egyesült Államok), és az ATCC 40326 letéti számot kapta. (A letét időpontja: 1987. május 20.).

(2) pCIB712 plazmid (E. coli MC1061 törzsben) az ATCC-nél letétbe helyezve, ahol az ATCC 64407 letéti számot kapta. (A letét dátuma: 1987. május 18.).

(3) pSCH1 plazmid (E. coli K12 törzsben) a Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DMS) törzsgyűjteménynél (Göttingen, Német Szövetségi Köztársaság) van letétbe helyezve, ahol a DSM 4129 letéti számot kapta. (A letét dátuma: 1987. május 29.).

(4) pCIB10/35SBt plazmid (E. coli MC1061 törzsben) az ATCC-nél van letétbe helyezve, ahol az ATCC 67329 letéti számot kapta (a letét időpontja: 1987. február 27.).

(5) pE16/8-c4 plazmid (E. coli HB101 törzsben) az ATCC-nél van letétbe helyezve, ahol az ATCC 67420 letéti számot kapta (a letét időpontja: 1987. május 29.).

(6) pCIB10/19SBt plazmid (E. coli HB101 törzsben) az ATCC-nél van letétbe helyezve, ahol az ATCC 67420 letéti számot kapta (a letét időpontja: 1987. május 29.).

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmányt.

A. kukorica- (Zea mays) növények regenerálása protoplasztokból

A jelen találmányban alkalmazott kallusz a Zea mays növények bármely szövetéből eredhet. A szövet előnyösen éretlen szövet, például éretlen kukoricahaj, éretlen embriók, fiatal levelek alapi része, és elvben Zea mays bármely más szövete, amely képes kalluszt képezni. Különösen hasznos szövet az éretlen Zea mays embriók pajzsocskája (scutellum).

Elvben minden Zea mays genotípus (változatok, termesztési variációk, tenyésztési vonalak, hibridek stb.) használható a jelen találmányban.

A legértékesebbek a nagyiparilag érdekes genotípusok.

Előnyös az összes elit genotípus, különösen az összes tenyésztési vonal, még előnyösebbek az elit tenyésztési vonalak. Alkalmas tenyésztési vonalak például a Funk 2717, Funk 211D, Funk 2N217A, B73, A632, CM105, B37, B84, B14, Mo17, R168, MS71, A188, FA91, A641 és W117 tenyésztési vonalak. A Funk 5N984 és Funk 5N986 a használható Zea mays genotípusok további példái. Különösen előnyösek a Funk 2717, Funk 2110, Funk 5N984 vagy Funk 2N217A elit tenyésztő vonalak és legelőnyösebb a Funk 2717 elit genotípus.

Az alábbi leírásban Funk 2717 embriogén szuszpenzióinak előállításához szolgáló módszert írunk le, amely szuszpenziókból protoplasztokat lehet izolálni, és amely képes termőképes növényeket regenerálni. Meg lehet érteni, hogy más kukorica-genotípusokat is lehet alkalmazni a leírt módszerben, legfeljebb rutinmódosítások-

kal, amelyek ismeretesek azok számára, akik a szakterületen jártasak.

(a) lépés. *Kalluszképzés*

Funk 2717 típusú Zea mays növényeket növesztünk virágzásig, és beporozzuk. Éretlen embriókat távolítunk el a magvakból, és beindító tápközegre helyezzük. Az embriók tipikusan 1–4 mm, előnyösen 1,5–3 mm, még előnyösebben 2–2,5 mm hosszúságúak. A beindító tápközeg lehet folyadék vagy szilárdított. Bármilyen beindító tápközeget, amely képes kalluszt létrehozni, lehet alkalmazni. Néhány megfelelő példa lehet (de nem csak ezekre korlátozva) az, amely MS-tápközegen [Murashige T. és Skoog F.: Physiol. Plant, *15*, 473 (1962)], N6-tápközegen [Chu és munkatársai: Scientia Sinica, *18*, 659 (1975)], B5-tápközegen [Gamborg O. és munkatársai: Exp. Cell Res., *50*, 151 (1968)], SH-tápközegen vagy KM-tápközegen alapul, cukrok és növényinövekedésszabályozók megfelelő koncentrációjával. Más megfelelő kombinációkat írnak le a „Plant Culture Media" (Növénytenyésztő tápközegek) című kiadványban (szerkesztők: George E. F. és munkatársai, Exegetics Ltd., Edington, Westburg, Wiltshire, Anglia, 1978).

A kalluszt eltávolítjuk a tenyésztett éretlen embriókról, és fenntartó tápközegre helyezzük. Bármilyen fenntartó tápközeg alkalmazható, amely a kallusz burjánzásának fenntartására képes. Alkalmas példák lehetnek (de nem csak ezekre korlátozódnak) az MS-tápközegen, N6-tápközegen, B5-tápközegen vagy KM-tápközegen alapuló tápközegek, megfelelő cukor- és növényi növekedésszabányozó koncentrációval. Az anyagokból friss fenntartó tápközegen altenyésztéseket végzünk megfelelő időközönként, például minden 1–20 napon, előnyösen minden 3–21 napon, és legelőnyösebben minden 5–14 napon. A beindítást és a fenntartást fényben vagy sötétben lehet végezni, előnyösen sötétben. A hőmérséklet 0 °C és 50 °C, előnyösen 20 °C és 32 °C, legelőnyösebben 25 °C és 28 °C között lehet.

Az altenyésztést folytatjuk azonos körülmények között, amíg a kallusz nem lesz speciális típusú kallusz. Ez a speciális típusú kallusz, amely a jelen találmány szerint beindító szuszpenziókban való felhasználásra alkalmas, viszonylag nem nyálkás és szemcsés és morzsalékos. Az 1. ábra mutatja be azt a kalluszt, amely alkalmas a találmány szerint embriogén szuszpenziók beindításában való felhasználáshoz. A megfelelő kalluszt altenyésztésnek vetjük alá megfelelő időközönként, például minden 1–120 napon, előnyösen minden 3–21 napon, és legelőnyösebben minden 5–14 napon. Az említett speciális típusú kallusz, amely képes termőképes Zea mays növényeket regenerálni, és amelyből termőképes növényekké regenerálódni képes protoplasztokat lehet izolálni, képviseli a jelen találmány egyik előnyös kiviteli módját.

Ezáltal a jelen találmány Zea mays kallusz előállítására vonatkozik, amely képes olyan szuszpenziós tenyészeteket termelni, amelyekből növényeket, előnyösen termőképes növényeket lehet regenerálni, és amelyből növények, előnyösen termőképes növények regenerálására képes protoplasztokat lehet regenerálni.

A jelen találmány foglalkozik Zea mays kallusztenyészetének előállításával is, amelyből protoplasztokat lehet előállítani, ahol a protoplasztok képesek regenerálódni termőképes növényekké; ez a módszer az alábbi lépésekből áll:

(a1) olyan kalluszt kinyerni, amely viszonylag nem nyálkás, valamint szemcsés és morzsalékos, egy kalluszkialakító vagy kalluszfenntartó tápközegen, és

(a2) az (a1) lépés kalluszát növeszteni valamely kalluszfenntartó tápközegen.

(b)–(d) lépések. *Szuszpenziós tenyészetek*

Az (a) lépésből származó speciális típusú kalluszt folyékony tápközegbe visszük át, hogy sejtek és sejtaggregátumok szuszpenzióját képezzük. A folyékony tápközegekre alkalmas példák lehetnek (de nem csak ezekre korlátozódnak) azok, amelyek MS-tápközegen, N6-tápközegen, B5-tápközegen és KM-tápközegen alapulnak, megfelelő koncentrációban cukrokkal és növénynövekedés-szabályozókkal együtt. Előnyösen a tápközeg N6-tápközeg.

A tenyészetekből altenyészeteket készítünk olyan gyakorisággal, amely a sejtek és sejtaggregátumok fenntartásához szükséges élő és burjánzó stádiumban, például minden 1–120 napon, előnyösen minden 3–21 napon, legelőnyösebben minden 5–10 napon. Azokat a tenyészeteket, amelyek sűrűn citoplazmás, osztódó sejtek aggregátumait tartalmazzák, megtartjuk. Azokat a tenyészeteket, amelyek nagy hányadban megnyúlt sejteket tartalmaznak, eldobjuk. Azoknak a sejteknek az aránya, amelyek sűrűn citoplazmásak, az idő előrehaladtával növekedhet (lásd a 2. és 3. ábrákat). A szuszpenziós tenyészet kívánt típusa olyan tenyészet, amely előnyösen legalább 50%, még előnyösebben 70% arányban tartalmaz olyan sejteket, amelyek sűrű, citoplazmás, osztódó sejtek aggregátumaiban vannak. A szuszpenziós tenyészet kívánt típusát megfelelő időtartam, általában mintegy 7 nap, előnyösen mintegy 30 nap után kapjuk meg. A hőmérsékleti és világítási körülmények általában azonosak azzal, amelyeket az (a) lépésben leírtunk. A szuszpenziós tenyészetet az ATCC-nél (Rockville, Maryland, Amerikai Egyesült Államok) letétbe helyeztük, ahol ez az ATCC 40326 letéti számot kapta (a letét időpontja: 1987. május 20.).

Ennek megfelelően tehát a találmány eljárást nyújt Zea mays sejtek és sejtaggregátumok szuszpenziós tenyészetének előállítására, amelyből protoplasztokat lehet izolálni, ahol ezek a protoplasztok képesek termőképes növényeket regenerálni; az eljárás az alábbi lépésekből áll:

(a) olyan kalluszt kinyerni, amely viszonylag nem nyálkás, valamint szemcsés és morzsalékos, kalluszkialakító vagy kalluszfenntartó tápközegen;

(b) a kalluszt átvinni folyékony tápközegbe, sejtek vagy sejtaggregátumok szuszpenzióját képezve;

(c) a szuszpenziót altenyésztésnek alávetni (i) olyan időtartamonként (előnyösen 7 napos időtartamonként), amely olyan élő, osztódó stádiumú protoplasztok nyeréséhez alkalmas, amelyek termőképes növényekké képesek regenerálódni, és (ii) olyan gyakorisággal, amely alkalmas bármilyen sejt vagy sejtaggregátum fenntartására élő állapotban; és

(d) a (c) lépés termékeiből azokat a tenyészeteket, amelyek sűrű, citoplazmás, osztódó sejteket tartalmaznak, kiválasztani és megtartani.

(e1) lépés. *Protoplasztok előállítása*

A protoplasztok izolálását úgy hajtjuk végre, hogy a kallusz- vagy szuszpenzióstenyészet-sejteket vagy sejtaggregátumokat [amelyeket a fenti (a)–(d) lépések szerint kaptunk] olyan enzimkészítménnyel inkubáljuk, amely eltávolítja a sejtfalakat. A megfelelő enzimkészítmények a szakterületen ismertek. Egy különösen alkalmas enzimkészítmény például olyan készítmény, amely 4% (tömeg/térfogat) RS cellulázt (Yakult Pharmaceutical Ind. Co. Ltd., Shingikan Cho, Nishinomiga, Japán) tartalmaz 1% (tömeg/térfogat) Rhozyme-val (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, Amerikai Egyesült Államok), KMC-sóoldatban (8,65 g/liter KCl, 12,5 g/liter $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 16,47 g/liter $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g/liter MES, pH 5,6). Az emésztést 0 °C és 50 °C, előnyösen 10 °C és 35 °C, legelőnyösebben 26 °C és 32 °C közti hőmérsékleten végezzük. Az emésztést addig folytatjuk, amíg protoplaszt bocsátódik ki. Az emésztéshez szükséges idő tipikusan 30 perc és 5 nap, előnyösen 1 óra és 1 nap, legelőnyösebben 3 és 5 óra között van.

Ennek megfelelően tehát a jelen találmány eljárást nyújt termőképes növények regenerálására képes Zea mays protoplasztok előállítására; az eljárás az alábbi lépésekből áll:

(a) olyan kalluszt kinyerni, amely viszonylag nem nyálkás, valamint szemcsés és morzsalékos, kalluszkialakító vagy kalluszfenntartó tápközegen;

(b) a kalluszt átvinni folyékony tápközegbe, sejtek vagy sejtaggregátumok szuszpenzióját képezve;

(c) a szuszpenziót altenyésztésnek alávetni (i) olyan időtartamonként (előnyösen 7 napos időtartamonként), amely olyan élő, osztódó stádiumú protoplasztok nyeréséhez alkalmas, amelyek termőképes növényekké képesek regenerálódni, és (ii) olyan gyakorisággal, amely alkalmas bármilyen sejt vagy sejtaggregátum fenntartására élő állapotban; és

(d) a (c) lépés termékeiből azokat a tenyészeteket, amelyek sűrű, citoplazmás, osztódó sejteket tartalmaznak, kiválasztani és megtartani;

(e1) a sejtfalakat megfelelő enzimekkel eltávolítani, és az így keletkező protoplasztokat izolálni.

A kibocsátott protoplasztokat összegyűjtjük, és standard módszerekkel, például szűréssel és centrifugálással tisztítjuk.

Ezek a protoplasztok és protoplaszt eredetű sejtek (a sejtfal regenerálása után), amelyek képesek termőképes Zea mays növényeket regenerálni, a jelen találmány előnyös tárgyai.

(e2) lépés. *A protoplasztok kezelése exogén DNS-sel*

A protoplasztokat lehet kezelni exogén DNS-sel úgy, hogy olyan sejteket állítunk elő, amelyek tartalmazzák az exogén DNS egészét vagy részét stabilan beépítve genetikai anyagába. Az exogén DNS lehet bármilyen, a protoplaszthoz adott DNS. Az exogén DNS tartalmazhat valamely, Zea maysban aktív promotort vagy hasznosíthat egy olyan promotort, amely már jelen van a Zea mays genomban. Az exogén DNS lehet egy kiméra gén vagy annak egy része. A protoplaszt kezelését exogén DNS-sel az alábbi közleményekben leírt módszerek szerint lehet végrehajtani: [Paszkowski J. és munkatársai: The EMBO Journal, *3*, N°12, 2717–2722 (1984); EP–0,164,575 számú európai szabadalmi bejelentés (Paszkowski J. és munkatársai); Shillito R. O. és munkatársai: Bio/Technology, *3*, 1099–1103 (1985); Potrykus I. és munkatársai: Mol. Gen. Genet., *199*, 183–188 (1985); Loerz H. és munkatársai: Mol. Gen. Genet., *199*, 178–182 (1985); Fromm M. E. és munkatársai: Nature, *319*, 791–793 (1986); GB–2, 140,822 számú brit szabadalmi bejelentés (Mettler I. J.); és Negrutiu I. és munkatársai: Plant Mol. Biology, *8*, 363–373 (1987)]. Ezeket a közleményeket referenciaként építjük be a jelen bejelentésbe.

Az exogén DNS-t bármilyen formában beadhatjuk, mint például csupasz lineáris vagy kör alakú DNS, liposzómákba bezárt DSN, DNS szferoplasztokban, DNS más növény protoplasztjaiban, DNS sókkal alkotott komplexben, DNS nukleoszómák, kromoszómák vagy sejtmagok formájában vagy mindezek részeként stb. Az idegen DNS felvételét lehet stimulálni bármilyen, a szakterületen ismert módszerrel, beleértve a fentebb idézett referenciákban leírt módszereket.

Elsődlegesen a jelen találmányban tervezett kiméra gének azok, amelyek a transzformált növényi protoplasztokat, protoplaszt eredetű szöveteket és végül protoplaszt eredetű növényeket szolgáltatnak új fenotípusos vonásokkal (értékes tulajdonságok), mint például megnövekedett rezisztencia kártevőkre (például ízeltlábúak, beleértve a rovarokat és atkákat, valamint a hematódákat stb.), megnövekedett rezisztencia patogénekre (például patogén gombák, baktériumok, vírusok stb.), megnövekedett rezisztencia vegyi anyagokra [például herbicidek (mint triazinok, karbamátok, karbamidok, dinitro-anilidek, szulfonil-karbamidok, imidazolinonok, triazopirimidinek, bialafosz, glifozát stb.), inszekticidek vagy más biocidok], megnövekedett ellenállás káros környezeti (edafikus vagy atmoszferikus) befolyások (például forróság, hideg, szél, talajviszonyok, nedvesség, szárazság stb.) ellen, kívánatos anyagok megnövekedett képződése [például levelekben, magokban, gumókban, gyökerekben, szárakban stb. A genetikailag megváltozott növények által termelt kívánatos anyagok között találhatók a fehérjék, keményítők, cukrok, aminosavak, alkaloidok, illatanyagok, színanyagok, zsírok stb.], nemkívánatos anyagok (például toxinok, proteáz inhibitorok, nemkívánatos illatanyagok, nemkívánatos fehérjék vagy szekunder metabolitok stb.) csökkentett képződése vagy módosított morfológiai vagy fejlődési fenotípusos jellemzők (például megváltozott magasság, növekedési viselkedés, forma, szín, erőteljesség, virágzási idő stb.).

A citotoxinokra való rezisztenciát egy, a növényi sejtekben olyan enzimet kifejező génnel vihetjük át, amely detoxikálja a citotoxint, például a II. típusú neomicin foszfotranszferáz vagy IV. típusú aminoglükozid foszfotranszferáz a kanamicin, higromicin és más aminoglükozid antibiotikumok detoxikálásához vagy glutation-S-transzferáz vagy citokróm P–450 vagy más katabolikus enzim, amelyről ismert, hogy detoxikálja a triazint, a szulfonil-karbamidot vagy más herbicideket. A citotoxinokra való ellenállást át lehet vinni olyan génnel is, amely a növényben egy olyan „célenzim" (a citotoxin akciójá-

nak helye) képződését fejezi ki, amely a citotoxinra rezisztens, például aceto-hidroxisav-szintáz képződését, amely érzékelten a szulfonil-karbamidok vagy imidazolinok vagy ennél a metabolikus lépésnél működő más herbicidek általi gátlásra vagy 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát (EPSP) szintáz képződését, amely érzéketlen a glifozát általi gátlásra. Előnyös lehet kifejezni ezeket a célenzimeket olyan formában, amely lehetővé teszi szállításukat a növényi sejtben a korrekt celluláris komponensbe, például a fenti példákban a kloroplasztokba.

Bizonyos esetben előnyös becélozni a géntermékeket a mitokondriumba, a vakuolumokba, az endoplazmatikus reticulumok vagy más sejtrészekbe vagy még az intercelluláris (apoplasztikus) terekbe is.

A rezisztenciát a gombák bizonyos osztályaira egy olyan gén bevezetésével vihetjük át, amely kitinázt fejez ki a növényi szövetekben. Sok növénypatogén gomba tartalmaz kitint, mint a hífa- és spóraszerkezet nélkülözhetetlen részét, például a Basidiomycetes (gombaüszög és rozsdagomba), Ascomycetes és Fungi imperferti (beleértve az Alternariát és Bipolarist, Exerohilum turicumot, Colletotricumot, Gleocercosporát és Cercosporát). A kitináz gátolhatja bizonyos patogének micéliumainak növekedését in vitro. Kitinázt kifejtő növényi levelek és gyökerek sok típusú gombatámadás ellen vannak védve.

A kártevők elleni ellenállást egy peszticid polipeptidet kódoló génnel lehet átvinni.

Ízeltlábúak elleni ellenállást például olyan polipeptidet kódoló génnel lehet átvinni, amely toxikus a lárva- és imágó stádiumra vagy a növényt nemkívánatossá teszi a lárvák számára olyan módon, hogy ezek csökkentik táplálkozásukat. Megfelelő gén ebben az összefüggésben a Bt kristályos fehérjéjének génje. A fehérjéknek egy másik osztálya, amely rovarok elleni rezisztenciát ad át, a proteáz inhibitorok. A proteáz inhibitorok a növényi tárolószerkezetek közönséges alkotórészei [Ryan C.: Ann. Rev. Plant. Physiol., *24*, 173–196 (1973)]. A rovar kifejlődésének gátlását tripszin inhibitorok jelenlétének tulajdonítják a lisztben [Lipke H., Fraenkel G. S. és Liener I. E.: J. Agr. Food. Chem., *2*, 410–414 (1954)]. A szójából izolált Bowman–Birk proteáz inhibitorról kimutatták, hogy gátolja a Tenebrio lárvák bélproteázait [Birk Y., Gertler A. és Khalef S.: Biochem. Biophys. Acta, *67*, 326–328 (1963)]. A tehénborsó tripszin inhibitort kódoló gént Hilder és munkatársai írják le [Nature, *330*, 160–163 (1987)].

Egy proteáz inhibitort kódoló gént lehet egy növényi promotor, előnyösen egy konstitutív promotor, mint például a karfiol-mozaikvírus (CaMV) 35S promotor szabályozása alá helyezni egy megfelelő vektorban, például az alább leírt pCIB 710 vektorban.

A gént, például a szója Bowman–Birk proteázinhibitor-kódoló szekvenciát, a Hammond és munkatársai által leírt cDNS-klónozó módszereket alkalmazva lehet nyerni [J. Biol. Chem., *259*, 9883–9890 (1984)]. A megfelelő klónt vagy a szelektált hibrid DNS immunprecipitálásával azonosíthatjuk, amint ezt Hammond és munkatársai leírták, vagy az aminosavszekvenciából kikövetkeztetett kódolószekvencia 5' végéből 50 vagy több bázist tartalmazó szintetikus oligonukleotiddal, mint vizsgáló mintával kis szigorúsággal végzett vizsgálattal [az aminosavszekvenciákat Fasman G. és munkatársai állították össze: Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, *2*, 611–620 (1976)]. Így például a szója Kunitz tripszininhibitor-gén klónozásához a következő oligonukleotidot alkalmazzuk vizsgálómintaként:

Aminosav: Asp Phe Val Leu Asp Asn Glu Gly Asn Pro Leu Glu Asn Gly
Vizsgálóminta: 5'– GAC TTC GTT CTG GAC AAC GAA GGT AAC CCG CTG GAA AAC GGT
Gly Thr Tyr Tyr Ile Leu Ser Asp Ile Thr Ala Phe Gly Gly
GGT ACC TAC TAC ATC CTG TCC GAC ATC ACC GCT TTC GGT GGT–3'

A klónozott DNS-fragmentumot szekvenciaelemzésnek vethetjük alá például Maxam és Gilbert módszerével [Methods Enzymol, *65*, 499–560 (1980)], és a transzlációs starthelyet azonosítjuk. Ha a klónozott DNS-fragmentum hosszabb, mint a kódolószekvencia, a többlet 5'- és 3'-szekvenciákat Bal31-gyel lehet levágni. Ha a klónozott DNS-fragmentum rövidebb, mint a kódolószekvencia, a klónozott DNS-t primerként alkalmazhatjuk primer kiterjesztéshez mRNS-sel [Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982), Cold Spring Harbor, New York], és a kiterjesztett DNS-t újra klónozzuk.

Megfelelő kapcsolókat (linker) adunk a fehérjét kódoló DNS-hez, és a fragmentumot a kiválasztott vektorba (kazetta), például pCIB 710-be iktatjuk olyan módon, hogy a gén a kívánt promotor szabályozása alatt legyen (CaMV a pCIb 710-ben).

Egy gén nyerésének alternatív módszere proteáz inhibitorokhoz, amelyek kevesebb, mint 100 aminosavval rendelkeznek, mint például a líma bab tripszin inhibitor, hogy szintetizáljuk azt. A kódolószekvencia kikövetkeztethető a visszatranszlációval és a kívánt vektorokhoz megfelelő restrikciós helyekből, amelyek mindkét végnél találhatók. A szintetikus gént 30–60 bázisból álló, átfedő oligonukleotidok szintézisével készítjük. Ezeket a fragmentumokat kinázzal kezeljük, ligáljuk (Maniatis és munkatársai, fentebb idézett munka), és a megfelelő vektorba klónozzuk.

Azt a klónt, amelynek beiktatása a korrekt orientációban van, szekvenciaelemzéssel azonosíthatjuk. A plazmid DNS-t izoláljuk, és felhasználjuk kukorica protoplasztba való beépítésre.

A jelen találmány tehát eljárást nyújt, amelyben a fenti lépéseken át leírt módszer tartalmazza még az alábbi lépést:

az (e1) lépés protoplasztjainak, amelyek termőképes növényekké képesek regenerálódni, kezelése exogén DNS-sel úgy, hogy olyan sejtek jöjjenek létre, amelyek az exogén DNS egészét vagy részét tartalmazzák, stabilan beépítve genetikai anyagukba.

A Zea mays protoplasztok vagy protoplaszt eredetű sejtek (a setjfal regenerálása után), amelyek képesek termőképes növényekké regenerálódni és különösen azok a Zea mays protoplasztok és sejtek, amelyek stabilan beépített exogén DNS-sel, előnyösen Zea maysban kifejezhető exogén DNS-sel rendelkeznek, további előnyös tárgyai a jelen bejelentésnek.

Különösen előnyösek azok a Zea mays protoplasztok vagy protoplaszt eredetű sejtek (a sejtfal regenerálása után), ahol az exogén DNS, normálisan egy kiméra gén, a transzformált növényt értékes tulajdonságokkal látja el, mint például megnövekedett rezisztencia kártevőkre (például ízeltlábúak, beleértve a rovarokat és atkákat, valamint nematódákat stb.), megnövekedett rezisztencia patogénekre (például fitopatogén gombák, baktériumok, vírusok stb.), megnövekedett rezisztencia vegyi anyagokra [például herbicidek (mint triazinok, karbamátok, karbamidok, dinitroanilidek, szulfonil-karbamidok, imidazolinok, triazo-pirimidinek, bialafosz, glifozát stb.), inszekticidek vagy más biocidok], megnövekedett ellenállás káros környezeti (edafikus vagy atmoszferikus) befolyások (például forróság, hideg, szél, talajviszonyok, nedvesség, szárazság stb.) ellen, kívánatos anyagok megnövekedett képződése [például levelekben, magokban, gumókban, gyökerekben, szárakban stb. A genetikailag megváltozott növények által termelt kívánatos anyagok között találhatók a fehérjék, keményítők, cukrok, aminosavak, alkaloidok, illatanyagok, színanyagok, zsírok stb.], nemkívánatos anyagok (például toxinok, proteáz inhibitorok, nemkívánatos illatanyagok, nemkívánatos fehérjék, zsírok, szénhidrátok vagy szekunder metabolitok) csökkentett képződése vagy módosított morfológiai vagy fejlődési fenotípusos jellemzők (például megváltozott magasság, növekedési viselkedés, forma, szín, erőteljesség, virágzási idő stb.).

Különösen előnyösek a transzgén Zea mays protoplasztok vagy protoplaszt eredetű sejtek közül azok a protoplasztok vagy sejtek, ahol a stabilan beépített exogén DNS olyan kiméra gén, amely lényegében egy Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival bíró polipeptidet kódol.

(f) lépés. *A protoplasztok tenyésztése*

A protoplasztokat tenyészetben tenyésztjük, DNS-sel való kezeléssel vagy kezelés nélkül, folyékony vagy megszilárdított tenyésztő tápközegben. Megfelelő tenyésztő tápközegekre példák (nem korlátozó jelleggel) azok, amelyek KM-tápközegen, N6-tápközegen, B5-tápközegen és MS-tápközegen alapulnak, cukrok és növénynövekedés-szabályozók megfelelő koncentrációjával. Az előnyös tápközeg szilárdítószert tartalmazó KM-tápközeg. Az előnyös szilárdítószer az agaróz, különösen a SeaPlaque^R agaróz [EP–0,129,668 számú európai szabadalmi bejelentés, Shillito R. D. és munkatársai (1984)]. Ahol ezt alkalmazzuk, a SeaPlaque^R agaróz koncentrációja 0,6% és 1,5% (tömeg/térfogat) között lehet. Az egyéb szilárdítószerek optimális koncentrációja változhat, de könnyen meghatározható.

A tápközeg, amelyben a protoplasztokat tenyésztjük, általában tartalmaz megfelelő növénynövekedés-szabályozókat (például auxinokat és/vagy citokineneket stb.), hogy támogassák a protoplasztokat osztódásra és telepek képzésére. A megfelelő növénynövekedés-szabályozók közt találjuk (a korlátozás szándéka nélkül) a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsavat (2,4-D), 3,6-diklór-2-metoxi-benzoesavat (dicamba), 4-amino-3,6,6-triklór-pikolinsavat (picloram) és para-klór-fenoxi-ecetsav (pCPA). A növekedésszabályozó mennyisége olyan legyen, hogy a növekedést hatékonyan szabályozza nemtoxikus mennyiségben. Az ilyen növénynövekedés-szabályozók koncentrációja általában 0,01–100 mg/liter, előnyösen 0,1–100 mg/l, előnyösebben 0,1–10 mg/l, legelőnyösebben 0,3–3 mg/liter tartományban van.

Meglepő módon úgy találtuk, hogy a (kis szénatomszámú)-alkanoil-szalicilsavak (acetil-szalicilsav, ASA és homológjai) egyedül vagy növénynövekedés-szabályozókkal és/vagy DMSO-val kombinálva elősegítik a növényi protoplasztok, előnyösen Zea mays protoplasztok osztódását vagy ezekből a protoplasztokból telepek képződését. A „kis szénatomszámú alkanoil" kifejezés olyan alkanoilcsoportokat képvisel, amelyek 1–7, előnyösen 1–4, legelőnyösebben 2–3 szénatomot tartalmaznak.

Előnyös (kis szénatomszámú)-alkanoil-szalicilsavak az acetil-szalicilsav és a propionil-szalicilsav, előnyösen az acetil-szalicilsav (ASA).

A (kis szénatomszámú)-alkanoil-szalicilsav mennyisége olyan mennyiség legyen, amely elegendő ahhoz, hogy elősegítse a sejtosztódást vagy telepképzést. Előnyös a növekedésszabályozáshoz hatékony, de nem toxikus mennyiség. Az ASA megfelelő koncentrációja a 0,1–3000 mg/liter, előnyösen 10–300 mg/liter, még előnyösebben 10–100 mg/liter tartományban van, és legelőnyösebben 100 mg/liter.

A DMSO mennyisége olyan mennyiség legyen, amely elegendő ahhoz, hogy elősegítse a sejtosztódást vagy telepképzést. A DMSO megfelelő koncentrációja a 0–3%, előnyösen 0,01–2%, még előnyösebben a 0,1–1% közti tartományban van.

Ennek megfelelően a jelen találmány eljárást nyújt növényi protoplasztok, előnyösen Zea mays protoplasztok osztódásának vagy ezekből a protoplasztokból a telepképzésnek a növelésére, az eljárás abból áll, hogy a protoplasztokat növekedésszabályozáshoz hatékony, de nem toxikus mennyiségű ASA jelenlétében tenyésztjük úgy, hogy ez a mennyiség elősegítse a sejtosztódást vagy telepképzést.

A jelen találmány egyik előnyös kiviteli formájában az említett módszer 0,01–100 mg/liter, előnyösen 0,1–100 mg/liter, még előnyösebben 0,1–10 mg/liter, legelőnyösebben 0,3–3 mg/liter növénynövekedés-szabályozót alkalmaz.

A jelen találmány egy további előnyös kiviteli formájában az említett módszer magában foglalja DMSO olyan mennyiségének jelenlétét, amely alkalmas sejtosztódás vagy telepképzés elősegítésére. A DMSO előnyös mennyisége 0% és 3%, előnyösen 0,01% és 2%, még előnyösebben 0,1% és 1% között van.

Ez a módszer a protoplasztokból való telepképzésnek vagy a protoplasztok osztódásának növelésére alkalmas az összes növényi protoplaszthoz, és nem korlátozó-

dik Zea maysra. Különösen alkalmas az Angiospermaehez és Gymnospermaehez, például a következő növénycsaládokhoz: Solanaceae, Cruciferae, Compositae, Liliaceae, Vitaceae, Chenopodiaceae, Rutaceae, Bromeliaceae, Rubidiaceae, Theaceae, Musaceae vagy Graminaceae vagy a Leguminoseae rendhez, főleg a Papilionaceae családhoz. Az előnyös növények a Solanaceae, Cruciferae család képviselői és a Gramineae.

A tápközeg, amelyben a protoplasztokat tenyésztjük, olyan tápközeget tartalmazhat, amelyet előzőleg megfelelő sejtek, például Zea mays vagy Dactylis glomerata sejtek növesztésével kondicionáltuk.

A protoplasztokat lehet tenyészteni szilárd vagy folyékony tápközegben altenyésztés nélkül 12 hetes időtartamon, előnyösen 6 hetes időtartamon, legelőnyösebben 3–4 hetes időtartamon át. Egy másik módszer szerint a szilárd tápközeget lehet helyettesíteni folyékony tápközeggel, amint ez az EP–0,129,668 számú európai szabadalmi bejelentésben le van írva [Shillito R. D. és munkatársai (1984)] vagy lehet kezelni bizonyos más módszerekkel is, hogy segítsük a protoplasztok osztódását és/vagy a protoplasztokból telepek képzését. Egyik megfelelő mód a tenyésztés „dajka" sejtekkel együtt, amint ezt Shneyour és munkatársai [Plant Science Lett., *33*, 293 (1984)], valamint Smith és munkatársai [Plant Science Lett., *36*, 67 (1984)] leírták, és ahogyan ez a 8s példában szerepel.

A protoplasztokat fényben vagy előnyösen sötétben tenyésztjük 0 °C és 50 °C, előnyösen 20 °C és 32 °C, legelőnyösebben 25 °C és 28 °C hőmérsékletek közti tartományban. A fényintenzitás tipikusan 0,1 és 200 μE/m²sec (mikroeinstein/m² másodperc), előnyösen 0,1 és 100 μE/m²sec, még előnyösebben 30 és 90 μE/m²sec és legelőnyösebben 10 és 40 μE/m²sec között van.

A 4. ábra mutatja be a protoplasztokból kifejlődő, szilárd tápközegen tenyésztett kalluszokat, és az 5. ábra mutatja be az (f) lépés szerint a protoplasztokból kifejlődött kalluszokat. Ezt a kalluszt azután altenyésztésnek vetjük alá fenntartó tápközegen, amint ezt a kalluszra az (a) lépésnél leírtuk, majd altenyésztésnek vetjük alá regeneráló tápközegen a (g) lépés szerint vagy közvetlenül végzünk altenyésztést regeneráló tápközegen a (g) lépés szerint.

(g) lépés. *A csíranövény regenerálása*

A kalluszt, amely az (f) lépés szerint protoplasztokból képződik, egyszer vagy többször altenyésztésnek vetjük alá megfelelő tápközegen úgy, hogy termőképes növény regenerálódjék. Az ilyen regeneráló tápközegek magukban foglalják (de nem csak ezekre korlátozódnak) azokat a tápközegeket, amelyek N6-tápközegen, B5-tápközegen, MS-tápközegen vagy KM-tápközegen alapulnak, cukrok, növénynövekedés-szabályozók és kívánt esetben DMSO megfelelő koncentrációival. Előnyös tápközeg az N6-tápközeg növénynövekedés-szabályozók nélkül vagy azok az N6-tápközegek, amelyek citokinint és/vagy más növénynövekedés-szabályozókat tartalmaznak a csíranövények regenerálását stimulálva és/vagy azok az N6-tápközegek, amelyek (kis szénatomszámú)-alkanoil-szalicilsavat tartalmaznak kívánt esetben tovább kombinálva DMSO-val, amint ezt fentebb az (f) lépésben leírtuk. Úgy tűnik, hogy a kallusz differenciált sejteket és sejtaggregátumokat tartalmaz (6. ábra) megfelelő időtartam, tipikusan 1 hét – 6 hónap, tipikusabban 1–3 hónap után. A kallusz tovább differenciálódik, csíranövényt képezve megfelelő időtartam, tipikusan 1 hét – 6 hónap, tipikusabban 1–3 hónap után.

A kalluszt ebben a stádiumban fényben tenyésztjük. A fényintenzitás tipikusan 0,1 és 100 μE/m²sec, előnyösen 30 és 80 μE/m²sec között van.

Különösen előnyös egy olyan módszer, ahol a sejtek vagy kalluszembriókat, vagy proembriókat képeznek, mielőtt regenerálódnának csíranövénnyé.

(h) lépés. *Termőképes növény nyerése a csíranövényből*

A csíranövényeket átvisszük megfelelő tápközegre, például növénynövekedés-szabályozók nélküli N6-tápközegre. Egy másik módszer szerint egy olyan növénynövekedés-szabályozót adhatunk hozzá, amely stimulálja a gyökér és hajtás növekedését. A csíranövényeket ezen a tápközegen tenyésztjük, amíg gyökereket nem fejlesztenek. A gyökérképződéshez szükséges idő tipikusan 1–6 hét, még tipikusabban mintegy 2 hét. Amikor a gyökér és a hajtás megfelelően kinőtt, a növényeket talajba visszük át, és enyhén megtámasztjuk. A gyökerek megfelelő hosszúsága ennél a stádiumnál 1–10 cm, tipikusabban 2–5 cm tartományban van, míg a hajtások hosszúsága 1–15 cm, tipikusan 2–10 cm tartományban.

A növényeket a virágzásig növesztjük, és szexuális utódot vagy vegetatív szaporítóanyagot kapunk a szokásos módon.

Az exogén DNS-t tartalmazó transzgén kukoricanövény-sejteket fenn lehet tartani tenyészetben vagy növényekké lehet regenerálni. A kukoricanövény-sejt, amelybe exogén DNS-t lehet bevezetni, lehet bármilyen kukoricanövény-sejt, amely képes befogadni, replikálni és kifejezni idegen géneket megfelelő szinten. Alkalmas kukoricanövény-sejtek lehetnek például a Funk 5N984, Funk 5N986, Funk 2717, Funk 211D, Funk 2N217A, B73, A632, CM105, B37, B84, B14, Mo17, R168, MS71, A188, FA91, A641 és W117 tenyésztővonalakból izolált sejtek. Előnyös az összes elit genotípus. Még előnyösebbek az összes tenyésztővonalak. A legelőnyösebbek az összes elit tenyésztővonalak, különösen a Funk 5N984, Funk 5N986, Funk 2717, Funk 2110 vagy Funk 2N217A elit tenyésztő vonalak, és legelőnyösebb a Funk 2717.

A tenyésztő tápközeg, amely képes fenntartani egy adott növényi sejtet tenyészetben, függhet az alkalmazott kukoricanövény-sejt genotípusától. Így például alkalmas tápközegek lehetnek (bár nemcsak ezekre korlátozódnak) azok, amelyek MS [Murashige és Skoog (1962)], N6 [Chu és munkatársai (1975)], B5 [Gamborg és munkatársai (1968)] és KM [Kao és Michayluk (1975)] tápközegeken alapulnak, megfelelő cukor- és növénynövekedés-szabályozó koncentrációval.

Így a jelen találmány eljárást nyújt Zea mays növények regenerálására protoplasztokból, az eljárás az alábbi, előbbiekben ismertetett lépésekből áll:

(e1) a (d) lépés sejtjeiből vagy sejtaggregátumaiból termőképes növényekké regenerálódni képes protoplasztok előállítása,

(f) a protoplasztok tenyésztése megfelelő tápközegben, amelyben a protoplasztok osztódnak és sejteket képeznek,
(g) az (f) lépésből kapott sejtek altenyésztése olyan módon, hogy csíranövények regenerálódjanak, és
(h) a csíranövények tenyésztése növesztő tápközegen, hogy termőképes növényeket kapjunk.

Előnyös módszer, amelyben a Zea mays protoplasztok stabilan beépített exogén DNS-t, előnyösen Zea mays növényekben kifejeződni képes exogén DNS-t tartalmaznak. Még előnyösebb az a módszer, ahol a Zea mays protoplasztokat 0,01–100 mg/liter növénynövekedés-szabályozó (előnyösen 2,4-D, dicamba, picloram vagy pCPA, legelőnyösebben 2,4-D) jelenlétében tenyésztjük, és olyan mennyiségű (kis szénatomszámú)-alkanoil-szalicilsav (előnyösen acetil-szalicilsav vagy propionil-szalicilsav, legelőnyösebben acetil-szalicilsav) jelenlétében, amely elegendő a sejtosztódás vagy sejtképzés elősegítésére. A legelőnyösebb az a módszer, amelyben DMSO is részt vesz olyan mennyiségben, amely elegendő a sejtosztódás vagy telepképződés elősegítésére.

A jelen találmány továbbá eljárást nyújt termőképes transzgén növényekké regenerálódni képes transzgén Zea mays protoplasztok előállítására, amely eljárás abból áll, hogy termőképes növényekké regenerálódni képes Zea mays protoplasztokat exogén DNS-sel kezelünk úgy, hogy olyan sejteket termeljen, amelyek az exogén DNS egészét vagy részét tartalmazzák genetikai anyagukba beépítve.

Ezeken kívül a jelen találmány protoplasztokból vagy protoplaszt eredetű sejtekből regenerált Zea mays növényekre és szaporítóanyagaikra irányul, valamint ezek utódaira. Előnyösek azok a regenerált növények, szaporítóanyagok és utódok, amelyek stabilan beépített exogén DNS-sel, előnyösen Zea maysban kifejezhető exogén DNS-sel rendelkeznek. Alklamas exogén DNS-ek például a korábban már leírt és a későbbiekben itt leírandó kiméra gének. A „szaporítóanyag" kifejezés magában foglal minden olyan növényi anyagot, amely szexuálisan vagy aszexuálisan szaporodni képes vagy in vivo vagy in vitro szaporodik. Az ilyen szaporítóanyagok előnyösen a regenerált növények protoplasztjai, sejtjei, kalluszai, szövetei, embriói vagy magjai. A regenerált növények és a regenerált transzgén növények utódai magukban foglalják a mutánsokat és variánsokat is.

B. *Inszekticid kukorica- (Zea mays) növények*

A jelen találmány kiméra Bt toxin gén előállítására irányul. A tervezett kukoricanövény sejtek lehetnek a kukoricanövények bármely genotípusából (változatok, termesztési változatok, tenyésztési vonalak, hibridek), amelybe idegen DNS-t lehet bevezetni, replikálni és kifejezni. Megfelelő kukoricanövény genotípusok lehetnek (de nem csak ezekre korlátozódnak) a tenyésztési vonalak, mint például a Funk 2717, Funk 2110, Funk 2N217A, B73, A632, CM105, B37, B84, B14, Mo17, R168, MS71, A188, FA91, A641 és W117. A Funk 5N984 és Funk 5N986 további példái az alkalmazható Zea mays genotípusoknak. A genotípus előnyösen valamely elit genotípus, még előnyösebben valamely elit tenyésztési vonal az alábbiak közül: Funk 5N984, Funk 5N986, Funk 2717, Funk 211D és Funk 2N217A és legelőnyösebben a Funk 2717 elit tenyésztési vonal.

A jelen találmány szerinti kiméra gén egy olyan promoter területet tartalmaz, amely hatékonyan működik kukoricanövényekben, és tartalmaz egy olyan kódolóterületet, amely Bt-ből származó kristályos fehérjét vagy egy olyan polipeptidet kódol, amely lényegében a Bt-ből származó kristályos fehérje inszekticid tulajdonságaival rendelkezik. A kiméra gén kódolószekvenciáiról nem ismeretes, hogy természetes génekben az említett promotorral lenne összekapcsolva.

Az 5'– és/vagy 3'–nem transzlatált területek a természetben egymástól függetlenül össze lehetnek kapcsolva vagy a promotorral, vagy a kódolóterülettel, vagy sem a promotorral, sem a kódolóterülettel. Előnyösen az 5'– vagy a 3'–nem transzlatált terület a természetes génekben lévő promotorral van összekapcsolva, és legelőnyösebben mind az 5', mind a 3' területek a természetes génekben lévő promotorral vannak összekapcsolva.

Nem lehetett előre látni a technika állására alapozva a bejelentés időpontjában, hogy a kukoricasejtek inszekticid polipeptideket legyenek képesek kifejezni bármilyen szinten, és különösen olyan szinten, amely elegendő ahhoz, hogy inszekticid tulajdonságokat adjon át a sejteknek. Különösen az olyan polipeptideknél, amelyek olyan nagyok és olyan oldhatatlanok, mint a Bt kristályos fehérjéjének rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkező fehérjék, rendkívül nehéznek volt várható a kifejeződés növényi sejtekben.

Abból a célból, hogy ezeket inszekticidnek tekinthessük, a növényi sejteknek tartalmazniuk kell inszekticid mennyiségben olyan toxint, amely lényegében a Bt-ből származó kristályos fehérje inszekticid aktivitásával rendelkezik. Inszekticid mennyiség az a mennyiség, amely, amikor a növényi sejtekben jelen van, elpusztítja a rovarlárvákat vagy legalábbis lényegesen csökkenti táplálkozásukat.

A gén

Az átírásszabályozó szekvenciák

A jelen találmány szerinti kiméra gén tartalmaz átírásszabályozó szekvenciákat, ezek promotorból és 5'– és 3'–nem transzlatált szekvenciákból állnak, amelyek működőképesek kukoricanövényekben. Ezek a szekvenciák – egymástól függetlenül – bármilyen forrásból származhatnak, például vírus-, növényi vagy baktériumgénekből.

A felhasználáshoz megfelelő vírusprompotorok és 5'– és 3'–nem transzlatált szekvenciák működőképesek kukoricanövényekben, és például olyan növényi vírusokból kaphatjuk ezeket, mint a karfiol-mozaikvírus. A karfiol-mozaikvírust Hohn és munkatársai írták le [Current Topics in Microbiology and Immunology, *96*, 194–220 és az A–G függelékek (1982)]. Ez a leírás ebbe a bejelentésbe referenciaként van beépítve.

A CaMV nem tipikus növényi vírus, amennyiben ez kettős szálú DNS-t tartalmaz. Legalább két CaMV promotor működőképes növényekben, nevezetesen a 19S promotor, amely a CaMV VI. gén átírását eredményezi, és a 35S átirat promotorja. A 19S promotor és a 35S

promotor az előnyös növényi víruspromotorok a jelen találmányban való felhasználáshoz.

A CaMV 19S promotorokat és 5'–nem transzlatált területeket egy restrikciós térkép segítségével kaphatjuk meg, amely Hohn és munkatársai fentebb említett közleményének 199. oldalán, a 4. ábrában van leírva, vagy Hohn és munkatársai közleményének C függelékében található szekvenciából.

Abból a célból, hogy a CaMV 19S promotort és kívánt esetben a szomszédos 5'–nem transzlatált területet izoláljuk, a kívánt szekvenciákat tartalmazó CaMV restrikciós fragmentumot kiválasztjuk. Megfelelő restrikciós fragmentum, amely a 19S promotort és az 5'–nem transzlatált területet tartalmazza, az a fragmentum, amely a Hohn és munkatársainak közleményében a 4. ábrában és a C függelékben ábrázolt képlet szerinti 5386. helynél induló PstI hely és az 5850. helynél induló HindIII hely között van.

Analóg módszerekkel lehet megkapni a 35S promotort is CaMV-ből, amint ezt a 6. példában leírjuk.

A restrikciós fragmentumban lévő nem kívánt nukleotidokat kívánt esetben standard módszerekkel lehet eltávolítani. Megfelelő módszerek lehetnek a nemkívánatos nukleotidok eltávolítására az exonukleázok alkalmazása [Maniatis és munkatársai: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 135–139 (1982)] és az oligonukleotid-irányított mutagenezis [Zoller és Smith: Meth. Enzymol., *100*, 468–500 (1983)].

Hasonló munkamenetet lehet alkalmazni egy kívánatos 3'–nem transzlatált terület nyerésére. Így például megfelelő CaMV 19S gén 3'–nem transzlatált területet kaphatunk olyan módon, hogy a Hohn és munkatársainak közleményében a 4. ábrában és a C függelékben ábrázolt képlet szerinti 7342. helynél lévő EcoRV hely és a 7643. helynél lévő BglII hely közti területet izoláljuk.

A jelen találmányban való felhasználáshoz alkalmas növényi gén promotorokra és 5'– és 3'–nem transzlatált területekre példák lehetnek még azoknak a géneknek a promotorjai és 5'– és 3'–nem transzlatált területei, amelyek a ribulóz bifoszfát karboxiláz kis alegységét és a klorofill a/b kötő fehérjét kódolják. Ezeket a növényi génterületeket növényi sejtekből lehet izolálni olyan módon, amely a CaMV-ból származó megfelelő területek izolálásánál már fentebb leírtakkal hasonlítható össze [lásd még: Morelli és munkatársai: Nature, *315*, 200–204 (1985)].

A bakteriális génekből származó megfelelő promotorok és 5'– és 3'–nem transzlatált területek lehetnek például azok, amelyek az Agrobacterium plazmidok T-DNS területében vannak jelen. Megfelelő Agrobacterium plazmidokra példák lehetnek az A. tumefaciens Ti plazmidja és az A. rhizogenes Ri plazmidja. A jelen találmányban található Agrobacterium promotorok és 5'– és 3'–nem transzlatált területek főleg azok, amelyek az oktopin szintázt és nopalin szintázt kódoló génekben vannak jelen. Ezeket a szekvenciákat olyan módszerrel kaphatjuk meg, amelyet a CaMV és növényi promotorok és nem transzlatált szekvenciák izolálásánál fentebb leírtunk [lásd még: Bevan és munkatársai: Nature, *304*, 184–187 (1983)].

A kódolóterület

A kiméra gén kódolóterülete olyan nukleotidszekvenciát tartalmaz, amely egy lényegében Bt delta-endotoxin kristályos fehérje toxicitási tulajdonsággal rendelkező polipeptidet kódol. A jelen találmány céljaihoz alkalmas polipeptid lényegében a Bt delta-endotoxin kristályos fehérje toxicitási tulajdonságaival bír, ha az rovarlárvákra hasonló nagyságrendben inszekticid hatású, mint valamely Bt alfajból származó kristályos fehérje. Néhány megfelelő alfaj például a Bt var. kurstaki, Bt. var. berliner, Bt. var. alesti, Bt var. tolworthi, Bt var. sotto, Bt var. dandrolimus, Bt var. san diego és Bt var. aizawai. Az előnyös alfaj a Bt var. kurstaki és különösen a Bt var. kurstaki HD1.

A kódolóterület létezhet természetes módon a Bt-ben. Egy másik módszer szerint a kódolóterület tartalmazhat egy olyan szekvenciát, amely különbözik attól a szekvenciától, amely a Bt-ben van, de ekvivalens azzal a genetikai kód degeneráltsága miatt.

A kiméra gén kódolószekvenciája kódolhat egy olyan polipeptidet is, amely különbözik a természetben előforduló kristályos fehérje delta-endotoxintól, de amely még lényegében rendelkezik a kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival. Az ilyen kódolószekvencia általában egy természetes kódolóterület variánsa. Egy természetes DNS-szekvencia „variánsa" a természetes szekvenciának olyan módosított formája, amely ugyanezt a funkciót látja el. A variáns lehet mutáció vagy lehet valamely szintetikus DNS-szekvencia, és lényegében homológ a megfelelő természetes szekvenciával. A „lényegi szekvenciahomológia" kifejezést úgy kell érteni, hogy az vagy olyan DNS-fragmentumra vonatkozik, amely egy másik DNS-fragmentumra megfelelően hasonló nukleotidszekvenciával bír, hogy hasonló tulajdonságokkal rendelkező fehérjét állítsunk elő; vagy olyan polipeptidre vonatkozik, amely egy másik polipeptidhez megfelelően hasonló aminosavszekvenciával bír, hogy hasonló tulajdonságokat mutasson. Normálisan egy DNS-szekvencia lényegében homológ egy második DNS-szekvenciával, ha a DNS-szekvencia aktív részeinek legalább 70%-a, előnyösen legalább 80%-a és legelőnyösebben legalább 90%-a homológ. Két különböző nukleotidot homológnak tekintünk kódolóterületük DNS-szekvenciájában a lényegi homológia meghatározása céljára, ha az egyik alkotóelem helyettesítése egy másikra csendes mutációt alkot.

A találmány így magában foglal bármely olyan kiméra gént, amely inszekticid tulajdonsággal bíró aminosavszekvenciát kódol, és amely a mellékelt és igényelt követelményeket kielégíti. Előnyös, ha a nukleotidszekvencia lényegében homológ az inszekticid aktivitásért felelős természetes szekvencia legalább egy részével vagy részeivel.

A jelen találmány szerinti kiméra gén által kifejezett polipeptid általában osztozik legalább néhány immunológiai tulajdonságában a természetes Bt kristályos fehérjével, mivel ez legalább néhány azonos antigén determinánssal bír.

Következésképpen a jelen találmány szerinti kiméra gén által kódolt polipeptid előnyösen szerkezetileg ro-

kon a Bt által termelt kristályos fehérje delta-endotoxinjával. A Bt kristályos fehérjét termel egy alegységgel, amely mintegy 130 000–140 000 molekulatömeggel rendelkező protoxin. Ezt az alegységet proteázokkal vagy alkáliákkal lehet elhasítani, hogy 50 000-nél nem nagyobb molekulatömegű, sőt lehetőleg még kisebb inszekticid fragmentum képződjék. Kiméra géneket, amelyek a protoxin ilyen jelen találmány szerinti fragmentumait vagy ennek még kisebb fragmentumait kódolják, addig lehet készíteni, amíg a fragmentum vagy a fragmentumok része még rendelkezik a szükséges inszekticid aktivitással. A protoxint, a protoxin inszekticid fragmentumait és ezeknek a fragmentumoknak az inszekticid részeit lehet fuzionálni más molekulákkal, például polipeptidekkel.

A jelen találmányban való alkalmazáshoz megfelelő kódolóterületeket Bt-ből izolált kristályos fehérje toxin génekből kaphatjuk meg, lásd például Whiteley és munkatársai: WO 86,01536 számú PCT közzétételi irat, valamint a 4,448,885 és 4,467,035 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírások. Előnyös az a nukleotidszekvencia, amely kristályos fehérjét kódol, és amely az I képlet szekvenciájában 156–3623. nukleotidként mutatkozik, vagy egy rövidebb szekvencia, amely egy ilyen kristályos fehérje inszekticid fragmentumát kódolja [Geiser és munkatársai: Gene, *48*, 109–118 (1986)] (az I képlet nukleotidszekvenciáját lásd a 13. ábrában).

A jelen találmány tehát olyan génre irányul, amely az I képlet nukleotidszekvenciájával bír, olyan génekre, amelyek lényegében szekvenciahomológiával rendelkeznek az I képlet génjével és olyan génekre, amelyek a II képlet szekvenciájával rendelkező polipeptidet kódolják vagy a II képlet szekvenciájával lényegében homológ szekvenciával bíró polipeptidet kódolnak, és előnyösek ezek közül a gének közül azok, amelyek növényekben, legelőnyösebben Zea maysban kifejezhetők.

Az I szekvencia 156–3623. nukleotidjai által meghatározott kódolóterület a II képletű szekvenciával rendelkező polipeptidet kódolja.

A II képlet szekvenciája

20
Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Gln
40
Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu
60
Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser Gln Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu
80
Val Asp Ile Ile Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
100
Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala Ile Ser Arg Leu
120
Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp
140
Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala
160
Leu Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
180
Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser Val Phe Gly Gln
200
Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile
220
Gly Asn Tyr Thr Asp His Ala Val Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly
240
Pro Asp Ser Arg Asp Trp Ile Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
260
Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Thr Tyr Pro Ile Arg Thr Val
280
Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe
300
Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu Gly Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu
320
Asn Ser Ile Thr Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Gln Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
340
Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro Leu Tyr Gly Tyr
360
Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg
380
Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu

400
Ser Val Leu Asp Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
420
Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln Asn Asn Asn Val
440
Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe
460
Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala
480
Glu Phe Asn Asn Ile Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr
500
Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu
520
Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg Val Asn Ile Thr Ala Pro Leu Ser
540
Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser
560
Ile Asp Gly Arg Pro Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Ser Asn
580
Leu Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Val Gly Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe Ser Asn Gly
600
Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala His Val Phe Asn Ser Gly Asn Glu Val Tyr Ile Asp
620
Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val Thr Phe Gln Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala
640
Gln Lys Ala Val Asn Glu Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val
660
Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Phe Cys
680
Leu Asp Glu Lys Lys Gln Leu Ser Gln Lys Val Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu
700
Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp
720
Arg Gly Ser Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Gln Asn Tyr Val
740
Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile Asp Glu
760
Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp
780
Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr
800
Gly Ser Leu Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His
820
His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp
840
Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu
860
Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp
880
Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu
900
Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile
920
Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu
940
Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe
960
Thr Ala Phe Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly
980
Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser

1000
Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly
1020
Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr
1040
Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu
1060
Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu
1080
Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val
1100
Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn
1120
Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr
1140
Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu
1156
Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu Vége

Így tehát a jelen találmány irányul továbbá a II képletű szekvenciával bíró polipeptidre vagy ennek a polipeptidnek inszekticid hatású részeire.

Ezenkívül bemutatjuk, hogy bizonyos Bt törzsek toxikusak pikkelyesszárnyú rovaroktól eltérő rovarokra is. Főleg a Bt var. tenebriosis toxikus a fedelesszárnyú rovarokra. A Bt san diego törzs toxicitását fedelesszárnyú rovarok ellen, valamint az ezzel kapcsolatos toxin gén szekvenciáját Herrnstadt és Soares tárgyalják (EP–0,202,739 és EP–0,213,818).

Vektorok

Abból a célból, hogy a jelen találmány szerinti kiméra gént növényi sejtekbe vezessük, a gént először valamely vektorba iktatjuk. Ha a gén nem áll rendelkezésre a transzformáláshoz elegendő mennyiségben, a vektort sokszorozni kell gazdasejtben végzett replikálással. A sokszorozáshoz legkényelmesebb gazdasejtek a baktérium- vagy élesztősejtek. Amikor megfelelő mennyiségű kiméra gén rendelkezésre áll, ezt a jelen találmány szerinti kukoricaprotoplasztokba vezetjük be. A gén bevezetése kukoricanövényekbe ugyanazokkal a vektorokkal történhet, amelyeket a replikáláshoz használunk, de történhet ezektől eltérő vektorokkal is.

A kiméra gének replikálásához alkalmas baktériumgazdasejtekre példák lehetnek az Escherichia nemzetség tagjai, például az E. coli és az Agrobacterium nemzetség tagjai, például az A. tumefaciens vagy A. rhizogenes. Heterológ gének klónozásának módszereit írják le Cohen és munkatársai (4,237,224 és 4,468,464 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentések).

A Bt kristályos fehérjéjét kódoló gének replikációját Wong és munkatársai írják le [J. Biol. Chem., *258*, 1960–1967 (1983)].

A jelen találmány génjeinek replikálására alkalmas élesztő gazdasejtekre példák lehetnek a Saccharomyces nemzetségbe tartozó törzsek sejtjei.

Bármilyen vektor, amelybe kiméra gént lehet beiktatni és amely megfelelő gazdasejtben, például baktériumban vagy élesztőben replikálódik, alkalmazható a jelen találmány szerinti gének sokszorozására. A vektor származhat például valamely fágból vagy plazmidból. A jelen találmány szerint alkalmazható fágokból származó vektorokra példák lehetnek az M13-ból és lambdából származó vektorok. Az M13-ból származó megfelelő vektorok lehetnek az M13 mp18 és M13 mmp19. A lambdából származó megfelelő vektorok lehetnek a lambda–gt11, a lambda–gt7 és a lambda Charon 4.

Plazmidokból származó vektorok, amelyek különösen alkalmasak baktériumokban való replikálásra, lehetnek a pBR322 [Bolivar és munkatársai: Gene, *2*, 95–113 (1977)], pUC18 és pUC19 [Narrander és munkatársai: Gene, *26*, 101–104 (1983)] és Ti plazmidok [Beven és munkatársai: Nature, *304*, 184–187 (1983)]. A gének baktériumokban való sokszorozásának előnyös vektorai a pBR322, pUC18 és pUC19.

A leírás további részeiben említett egyes plazmidokat a következő irodalmi helyek ismertetik:

– pRK290 plazmid: ez a természetben előforduló, tág gazdaszervezet tartománnyal rendelkező RK2 plazmidból származtatható le. Előállítását Ditta et al. írja le (Proc. Natl. Acad. Sci., 77, p. 7347–7351, 1980; lásd különösen a 7349. oldalon szereplő 2. ábrát).

– pRK252 plazmid: ez a pRK248-ból (amely ugyancsak az RK2 származéka) vezethető le. Előállítását Ditta et al. írja le (Plasmid 13, p. 149–153, 1985; lásd különösen a 152. oldalt). A pRK48 előállítását Thomas et al. (J. Bact., 141, p. 213–222, 1980) ismerteti.

Vektorok megalkotása replikációhoz

Abból a célból, hogy baktériumokban való replikációhoz alkalmas kiméra géneket alkossunk meg, egy promotor szekvenciát, egy 5'–nem transzlatált szekvenciát, egy kódolószekvenciát és egy 3'–nem transzlatált szekvenciát vagy hozzáillesztünk megfelelő sorrendben alkalmas vektorhoz, vagy beiktatunk megfelelő vektorba, például valamely fentebb leírt vektorba. A fenti célból ennek a vektornak képesnek kell lennie arra, hogy replikálódjék a gazdaszervezetben.

A promotorot, 5'–nem transzlatált területet, kódolóterülete és 3'–nem transzlatált területet, amelyek a találmány szerinti kiméra gént alkotja, először egy egységbe lehet kombinálni a vektoron kívül, majd ezután lehet beiktatni a vektorba. Egy másik módszer szerint a

kiméra gén részleteit külön-külön lehet beiktatni a vektorba. A vektor előnyösen tartalmaz még egy gént, amely jellemző vonást ad át a gazdasejtnek, lehetővé téve a vektort tartalmazó sejtek szelekcióját. Az előnyös jellemző vonás az antibiotikumrezisztencia. Az alkalmas antibiotikumokra példák lehetnek az ampicillin, tetraciklin, higromicin, G418 és neomicin.

A gén beiktatását vagy vektorban való összeállítását standard módszerekkel hajthatjuk végre, ilyen például rekombináns DNS alkalmazása [Maniatis és munkatársai (1982)] és homológ rekombináció [Hinnen és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci., *75*, 1929–1933 (1978)].

Ismert rekombináns DNS-módszereket alkalmazva a vektort elhasítjuk, a kívánt DNS-szekvenciát beiktatjuk a vektor hasított darabjai közé, és a kívánt DNS-szekvencia végeit a vektor megfelelő végeihez ligáljuk.

A vektort legkényelmesebben megfelelő restrikciós endonukleázokkal hasítjuk. Megfelelő restrikciós endonukleázok lehetnek azok, amelyek tompa végeket képeznek, ilyenek az SmaI, HpaI és EcoRV és azok, amelyek kohezív végeket képeznek, ilyenek az EcoRI, XocI és BamHI.

A kívánt DNS-szekvencia egy nagyobb DNS-molekula részeként létezik, ilyen nagyobb DNS-molekula lehet a kromoszóma, plazmid, transzpozon vagy fág. A kívánt DNS-szekvenciát forrásából kivágjuk, és kívánt esetben úgy módosítjuk, hogy a végeket össze lehessen kötni a hasított vektor végeivel. Ha a kívánt DNS-szekvencia végei és a hasított vektor végei tompa végek, ezeket tompavég-ligázokkal, például T4 DNS-ligázzal egyesítjük.

A kívánt DNS-szekvencia végeit egyesíthetjük a hasított vektor végeihez kohezív végek formájában is, amely esetben egy kohezív vég ligázt, amely lehet T4 DNS ligáz is, alkalmazunk. Egy másik alkalmas kohezív vég ligáz lehet például az E. coli DNS ligáz.

A kohezív végeket a legkényelmesebben úgy lehet képezni, hogy a kívánt DNS-szekvenciát és a vektort ugyanavval a restrikciós endonukleázzal hasítjuk. Ilyen esetben a kívánt DNS-szekvencia és a hasított vektor olyan kohezív végekkel rendelkeznek, amelyek komplementerek egymásra.

A kohezív végeket úgy is ki lehet alakítani, hogy komplementer homopolimer farkakat adunk a kívánt DNS-szekvencia és a hasított vektor végeire, terminális dezoxi-nukleotidil transzferázt alkalmazva, vagy egy adott restrikciós endonukleáz által felismert szintetikus oligonukleotidszekvenciát, amely linkerként ismeretes, adunk hozzá, és a szekvenciát az endonukleázzal elhasítjuk [lásd Maniatis és munkatársai (1982)].

Vektorok megalkotása növények transzformálásához

A Bt toxint vagy Bt-szerű toxint kódoló kiméra génen kívül a vektorok előnyösen tartalmaznak egy olyan DNS-szekvenciát is, amely lehetővé teszi a vektort tartalmazó kukoricanövény sejtek kiválasztását vagy átvizsgálását olyan sejtek jelenlétében, amelyek nem tartalmazzák a vektort. Az ilyen szelektálható vagy átvizsgálható markerek természetes módon jelen lehetnek a vektorban, amelybe a jelen találmány szerinti kiméra gént bevezetjük vagy bevezethetjük a vektorba vagy azelőtt vagy azután, hogy a kiméra gént bevezetjük. Egy másik módszer szerint a szelektálható vagy átvizsgálható marker gént vagy egy részét először lehet egyesíteni a kívánt kiméra génnel vagy annak bármely részével, és a rekombinált géneket vagy génszegmenseket egy egységként lehet bevezetni a vektorba. A szelektálható vagy átvizsgálható marker maga is lehet kiméra.

Előnyös szelektálható marker valamely antibiotikum rezisztenciát kódoló gén. A génnek képesnek kell lennie kifejeződni a transzformálandó sejtekben. A sejteket valamely antibiotikumot tartalmazó tápközegben lehet tenyészteni, és azokat a vektort tartalmazó sejteket, amelyeknek megnövekedett képessége van túlélésre a tápközegben, kiválaszthatjuk. Azok a gének, amelyek rezisztenciát visznek át kukoricatoxinokra, például higromicinre vagy G418-ra, hasznosak lehetnek szelektálható markerként.

Olyan génekre, amelyek antibiotikum rezisztenciát visznek át, példák lehetnek a neomicin foszfotranszferáz [kanamicin és G418 rezisztencia, Velter és munkatársai: EMBO J., *3*, 2723–2730 (1984)], higromicin foszfotranszferáz [higromicin rezisztencia, van den Elzen és munkatársai: Plant Molec. Biol., *5*, 299–302 (1985)].

Kukoricanövények transzformálására előnyös vektorok között találjuk a CaMV 35S promotort működőképesen összekapcsolva egy Bt toxint kódolóterülettel, és a CaMV 35S promotort működőképesen összekapcsolva valamely szelektálható markerrel, például G418 rezisztenciával és higromicin rezisztenciával. Ilyen vektorokra példák a pCIB710/35S (G418 rezisztencia) és pIRV (higromicin rezisztencia), amint ezeket a későbbiekben leírjuk.

A jelen találmány magában foglal termőképes kukoricanövényeket, amelynek sejtjei azt a kiméra gént tartalmazzák, amely egy Bt kristályos toxint fejez ki, vagy egy olyan polipeptidet fejez ki, amely lényegében a Bt kristályos toxin rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkezik.

Inszekticidek

A jelen találmány szerinti növényi sejtek tartalmazzák a kiméra gént, és ezeket annak a polipeptidnek az előállítására lehet alkalmazni, amely lényegében egy Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkezik. A közvetlenül inszekticidként alkalmazott növényi sejtek lehetnek tenyésztett növényi sejtek vagy lehetnek egy élő növény komponensei.

A toxint lehet izolálni is a növényi sejtekből ismert módszerekkel, például extrakcióval vagy kromatográfiával. A kivonat lehet a teljes növényi sejtkivonat, részben tisztított kivonat vagy a polipeptid tisztított készítménye. Bármilyen ilyen kivonatot vagy kromatográfiás izolátumot ugyanolyan módon lehet alkalmazni, mint a Bt-ből származó kristályos fehérjét [lásd például Deacon: Aspects of Microbiology, *7*, (1983), szerkesztők: Cole és munkatársai, kiadó: American Society for Microbiology; és Miller és munkatársai: Science, *219*, 715 (1983)].

A jelen találmány inszekticid sejtjei toxikusak azokra a pikkelyesszárnyú rovarokra, amelyek megtámadják a kukoricasejteket és növényeket, ilyenek például a kukoricaféreg (Heliothis zea) és az európai kukorica fúró-

rovar (Ostrinia nubialis). Ezen túl a Bt var. tenebrionis kristályos toxin génjét viselő kukoricasejtek toxikusak fedelesszárnyú rovarkártevőkre. A fedelesszárnyúak (Coleoptera) rendjébe tartozó fontos rovarkártevők például a kolorádó burgonyabogár, a gyapotzsizsik és a kukoricagyökér-féreg.

Így tehát a jelen találmány eljárást nyújt egy polipeptid termelésére Zea maysban, amely polipeptid lényegében egy Bacillus thüringiensis kristályos fehérje rovartoxicitási tulajdonságaival rendelkezik, a módszer abban áll, hogy

(a) Zea mays sejtekbe egy, lényegében valamely Bt kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkező polipeptidet kódoló gént vezetünk be, ahol a gén promotorja, 5'–nem transzlatált területe és kívánt esetben 3'–nem transzlatált területe növényből vagy növényivírus-génből származik, és

(b) a polipeptidet kifejezzük.

A jelen találmány módszert nyújt rovarlárvák megfékezésére is, amely abból áll, hogy a lárvákkal inszekticid mennyiségű, egy Bacillus thüringiensis kristályos toxint vagy lényegében egy Bacillus thüringiensis kristályos fehérje rovar-toxicitási tulajdonságaival rendelkező polipeptidet kódoló gént tartalmazó transzgén Zea mays sejteket etetünk meg.

A jelen találmány magában foglal egy módszert pikkelyesszárnyúak lárváinak elpusztítására vagy megfékezésére, a módszer abban áll, hogy a lárvákkal inszekticid mennyiségben olyan transzgén kukoricanövény-sejteket etetünk, amelyek a jelen találmány szerinti kiméra gént tartalmazzák. A növényi sejtek lehetnek tenyésztett növénysejtek vagy lehetnek élő növények komponensei. Ezen túl a jelen találmány eljárást nyújt fedelesszárnyúak lárváinak elpusztítására is, inszekticid mennyiséget etetve velük olyan sejtekből, amelyek a Bt var. tenebrionis kristályos toxint vagy inszekticid részeit kódolószekvenciával rendelkező kiméra gént tartalmazzák.

A jelen találmány továbbá a jelen találmány szerint genetikailag manipulált növények kukoricamagjait is magában foglalja, amennyiben ez tartalmazza a beiktatott kiméra gént és az ebből kialakult kívánatos jellemző vonást. A jelen találmány módszerével termelt növények utódai, beleértve a szexuális és vegetatív utódokat, további kiviteli módokat jelentenek. A szexuális utódok keletkezhetnek öntermékenyítéssel vagy keresztbeporzással.

Hasznosság

A jelen találmány módszere lehetővé teszi, hogy a Zea mays protoplasztjai termőképes növényekké regenerálódjanak. Ez a lehetőség képessé tesz bárkit, hogy exogén DNS-t (például Bt kristályos fehérjét kódoló gén) stabilan bevezessen az ilyen növények genomjába, és megváltoztassa fenotípusukat. Ezenkívül a protoplasztokat lehet fuzionálni ugyanazzal vagy más fajjal, abból a célból, hogy mag DNS új kombinációit állítsuk elő vagy mag- és organellum DNS új kombinációit. Ez az utóbbi lehetőség képessé tesz valakit például új, hím steril növények megalkotására tenyésztési célokra. Ezenkívül a protoplasztokat alkalmazhatjuk klónozó anyag forrásaként, amelyen mutagenezist és/vagy szelekciót lehet végrehajtani kívánt fenotípusra. A kívánt fenotípusra példák lehetnek a megnövekedett rezisztencia fitotoxikus vegyi anyagokra, patogénekre és káros környezeti körülményekre, módosított morfológiai vagy fejlődési tulajdonságok és metabolikus anyagok megváltozott tartalma.

Kiviteli példák

1a példa. Funk 2717 genotípusú Zea mays kallusz speciális típusának előállítása

Funk 2717 genotípusú Zea mays növényeket növesztünk virágzásig üvegházban, és beporozzuk ugyanabból a genotípusból származó pollennel. 1,5–2,5 mm hosszúságú embriókat tartalmazó éretlen csöveket távolítunk el a növényről, és 10%-os Clorox^R-oldattal sterilizáljuk 20 percen át. Az embriókat eltávolítjuk a tövükből, és az embrió tengelyével lefelé Murashige és Skog tápközegre [Physiol. Plant., *15*, 473–493 (1962)] helyezzük, a tápközeg tartalmaz 0,1 mg/liter 2,4-D-t, 6% (tömeg/térfogat) szacharózt és 25 mmol/liter L-prolint és 0,24% (tömeg/térfogat) Gelrite^R-rel van szilárdítva (beindító tápközeg). Kéthetes, sötétben, 27 °C hőmérsékleten végzett tenyésztés után a pajzsocskán (scutellum) kifejlődő kalluszt eltávolítjuk az embrióból, és B5-tápközegre helyezzük (0,5 mg/liter 2,4-D), amely Gelrite^R-rel van szilárdítva. Az anyagot minden két hétben altenyésztésnek vetjük alá friss tápközegen. Mintegy 8 héttel azután, hogy az embriókat a beindító tápközegre helyeztük, a kallusz speciális típusát jellegzetes morfológiája alapján azonosítjuk. Ezt a kalluszt további altenyésztésnek vetjük alá azonos tápközegen. További két hónapos időtartam után a kalluszt átvisszük 2 mg/l 2,4-D-t tartalmazó és Gelrite^R-rel szilárdított N6-tápközegre, és ezen sorozatos altenyésztésnek vetjük alá.

1b példa. Funk 5N984 genotípusú Zea mays kallusz speciális típusának előállítása

Funk 5N984 genotípusú Zea mays növényeket növesztünk virágzásig üvegházban, és beporozzuk ugyanabból a genotípusból származó pollennel. 1,5–2,5 mm hosszúságú embriókat tartalmazó éretlen csöveket távolítunk el a növényről, és 10%-os Clorox^R-oldattal sterilizáljuk 20 percen át. Az embriókat eltávolítjuk tövükről, és az embrió tengelyével lefelé Schenk- és Hildebrandt-tápközegre [Can. J. Bot., *50*, 199–204 (1972)] helyezzük, a tápközeg tartalmaz 1,0 mg/liter 2,4-D-t, 2% (tömeg/térfogat) szacharózt, 100 mg/liter kazein-hidrolizátumot, 100 mg/liter mio-inozitot és 25 mmol/liter L-prolint és 0,8% (tömeg/térfogat) Phytagar^R tápközeggel van szilárdítva (beindító tápközeg). Kéthetes tenyésztés után sötétben, 27 °C hőmérsékleten egy előnyös kalluszt ismerünk fel jól formált, gömb alakú, szomatikus embriók jelenléte révén, amelyek bizonyos explanátumok pajzsocskáján fejlődnek ki. Ezeket a kalluszokat eltávolítjuk, és vagy B5-tápközegre [0,5 mg/liter 2,4-D és 2% (tömeg/térfogat) szacharóz, 100 mg/liter kazein-hidrolizátum, 100 mg/liter mio-inozit és 25 mmol/liter L-prolin] vagy Schenk- és Hildebrandt-tápközegre (amelyet fentebb írtunk le) helyezzük. Az anyagot minden két hétben altenyésztésnek vetjük alá friss tápközegen. Leg-

alább 8 héttel azután, hogy az embriókat a beindító tápközegre helyeztük, a speciális típusú kalluszt jellegzetes morfológiája alapján azonosítjuk. A speciális típusú kalluszt további altenyésztésnek vethetjük alá azonos tápközegen, de előnyösen átvisszük 2 mg/liter 2,4-D-t tartalmazó és 0,24% (tömeg/térfogat) Gelrite^R-rel szilárdított N6-tápközegre, és ezen sorozatos altenyésztésnek vetjük alá.

Embriogén szuszpenziós tenyészeteket hozunk létre ezekből a kallusztenyészetekből a 2. példában körvonalazott módszerrel.

2. példa. Funk 2717 genotípusú Zea mays szuszpenziójának előállítása

Az 1a példában leírt kallusz tenyészetben marad összesen legalább 6 hónapig. Az altenyészethez kiválasztott kallusz típusa viszonylag nem nyálkás és szemcsés és nagyon morzsalékos, úgyhogy ez egyedi sejtaggregátumokba különül el, ha folyékony tápközegre helyezzük. Nagy, megnyúlt sejtekkel bíró aggregátumokat tartalmazó tenyészeteket nem tartunk meg.

A fenti (a) lépésben leírt, Funk 2717 elit genotípusú Zea mays speciális kalluszokból mintegy 500 mg-os alikvotokat 30 ml, 2 mg/liter 2,4-D-t tartalmazó N6-tápközegre helyezünk 125 ml-es Delong-palackokban. A tenyészet 1 hetes, 26 °C hőmérsékleten, sötétben, forgó rázógépen (130 fordulat/perc, 2,5 cm-es kitérés) végzett tenyésztése után a tápközeget friss tápközeggel helyettesítjük. A szuszpenziókat ezen a módon újabb egy hét után ismét altenyésztésnek vetjük alá.

Ez után az idő után a tenyészeteket átvizsgáljuk, és azokat, amelyek nem mutatnak nagyszámú megnyúlt sejtet, megőrizzük. A nagy, megnyúlt sejtekkel bíró aggregátumokat tartalmazó szuszpenziós tenyészeteket eldobjuk. Az előnyös szövet sűrűn citoplazmás, osztódó sejtaggregátumokat tartalmaz, amely jellegzetesen simább felülettel bír, mint a sejtaggregátumok többsége. A megőrzött tenyészetekben ezek a kis aggregátumok legalább 50%-ot képviselnek. Ez a kívánt morfológia. Ezek a szuszpenziók nagy növekedési sebességgel bírnak, kevesebb, mint 1 hét kettőződési idővel. A szuszpenziós tenyészeteket hetenként altenyésztésnek vetjük alá, 0,5 ml „becsomagolt" sejttérfogatot (PVC) helyezve át friss tápközegre (PVC: leülepedett sejttérfogat pipettában). Az ilyen módon végzett altenyésztés 4–6 hete után a tenyészetek az altenyészetben hetenként 2–3-szorosra növekednek. Azokat a tenyészeteket, amelyekben a sejtek több, mint 75%-a a kívánt morfológiával rendelkezik, megőrizzük további altenyésztéshez. A tenyészeteket úgy tartjuk fenn, hogy altenyésztéshez mindig azt a lombikot választjuk ki, amelynek tartalma a legjobb morfológiát mutatja. Időszakonként szűrést alkalmazunk 630 mikrométer pórusméretű rozsdamentes acélszűrőkön keresztül (2 hetenként) bizonyos esetekben, hogy növeljük a tenyészetek diszperzióját, de ez nem feltétlenül szükséges.

A 6–217–CG (Funk 2717) Zea mays szuszpenziós tenyészetet az ATCC-nél deponáltuk 40326 letéti számon. Ez a deponálás a Budapesti Szerződéssel összhangban történt (a deponálás időpontja: 1987. május 20.).

3. példa. Protoplasztok készítése Zea mays szuszpenziós tenyészeteiből

1–1,5 ml PVC-t a 2. példa szerint készített szuszpenziós tenyészetből inkubálunk 10–15 ml olyan keverékben, amely 4% (tömeg/térfogat) RS cellulázt tartalmaz 1% Rhozyme-val KMC-sóoldatban (8,65 g/liter KCl, 16,47 g/liter $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ és 12,5 g/lietr $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 5 g/liter MES, pH 5,6). Emésztést végzünk 30 °C hőmérsékleten forgó táblán, 3–4 órás időtartamon át. A készítményt inverz mikroszkópon át figyeljük protoplaszt kibocsátásra.

A protoplasztokat, amelyek kibocsátódtak, a következőképpen gyűjtjük össze. A készítményt 100 μm-es lyukbőségű szűrőn át, majd 50 μm-es lyukbőségű szűrőn át szűrjük. A protoplasztokat a szűrőn át mossuk az enzimoldat eredeti térfogatával azonos térfogatú KMC-sóoldattal. 10 ml protoplasztkészítményt helyezünk eldobható műanyag centrifugacsövekbe, és 1,5–2 ml 0,6 mol/literes szacharózoldatot [5,6 pH-ra pufferolva 0,1% (tömeg/térfogat) morfolino-etánszulfonsavval (MES) és KOH-val] rétegzünk alá. A csövet 60–100 g-vel centrifugáljuk 10 percen át, és a határfelületen csíkként jelentkező protoplasztokat összegyűjtjük, és friss csőbe visszük át.

A protoplasztkészítményeket újból szuszpendáljuk 10 ml friss KMC-sóoldatban, és 5 percen át centrifugáljuk 60–100 g-nél. A felülúszót kinyerjük és eldobjuk, és a protoplasztokat gyengéden szuszpendáljuk a megmaradó cseppben, majd fokozatosan 10 ml 13/14 erősségű KMC-oldatot (13 rész KHC törzsoldat + 1 rész víz) adunk hozzá. Újabb, mintegy 5 perces centrifugálás után a felülúszót ismét eltávolítjuk, és a protoplasztokat újra szuszpendáljuk 6/7 erősségű KMC-oldatban (6 rész KMC törzsoldat + 1 rész víz). Alikvotot veszünk ki számláláshoz, és a protoplasztokat ismét leülepítjük centrifugálással. A protoplasztokat újra szuszpendáljuk 10^7/ml arányban KM tápközegben (1. táblázat) vagy mannitoldatban, amelynek ozmolalitása a KM tápközegével azonos, és amely 6 mmol/l $MgCl_2$-t tartalmaz, vagy bármely, a transzformációban való felhasználáshoz alkalmas egyéb tápközegben, amilyeneket a későbbi példákban leírunk. Ezt a protoplasztot alkalmazzuk tenyésztéshez, amint ezt a 8a példában leírjuk vagy ahol az a cél, protoplasztok transzformálásához, amint ezt a 8. és 9. példában leírjuk.

4. példa. Általános rekombináns DNS-technikák

Mivel a jelen találmányban alkalmazott rekombináns DNS-technikák többsége rutinművelet azok számára, akik a szakterületen jártasak, ezeknek az általánosan alkalmazott technikáknak a rövid leírását itt adjuk meg ahelyett, hogy az egyes példáknál, amelyeket az alábbiakban leírunk, tennénk meg ezt. Kivéve azokon a helyeken, ahol ezt jelezzük, az összes rutinművelet le van írva Maniatis és munkatársai korábban már idézett munkájában (1982).

A. *Restrikciós endonukleázos emésztés*

Tipikusan a DNS a reakciókeverékben mintegy 50–500 μg/ml mennyiségben van jelen a gyártó (New England Biolabs, Beverly, MA) által javasolt puffer-

oldatban. 2–5 egység, előnyösen 100 μg/ml restrikciós endonukleázt adunk minden μg DNS-hez, és a reakciókeveréket a gyártó által javasolt hőmérsékleten inkubáljuk 1–3, előnyösen 2 órán át. A reakciót 65 °C hőmérsékleten, 10 percen át végzett melegítéssel állítjuk le vagy fenollal végzett extrahálással, ezt követi a DNS kicsapása etanollal. Ezt a technikát leírják Maniatis és munkatársai is, korábban idézett munkájuk 104–106. oldalán.

B. *DNS kezelése polimerázzal, hogy szintbe hozott végeket képezzünk*

DNS-t adunk 50–500 μg/ml, előnyösen 100 μg/ml mennyiségben egy olyan reakciókeverékbe, amely a gyártó (New England Biolabs) által javasolt puffert tartalmaz. A reakciókeverék tartalmazza mind a négy dezoxinukleotid-trifoszfátot 0,2 mmol/l koncentrációban. A reakciókeveréket 15 °C hőmérsékleten inkubáljuk 30 percen át, majd a reakciót 65 °C hőmérsékleten, 10 percen át végzett melegítéssel állítjuk le. A restrikciós endonukleázokkal végzett emésztéssel termelt fragmentumokhoz, amelyek az 5'–túlnyúló végeket alkotják, a DNS-polimeráz nagy vagy Klenow-fragmentumát alkalmazzuk. Az olyan endonukleázokkal termelt fragmentumokhoz, amelyek a 3'–túlnyúló végeket termelik, mint például PstI és SacI, T4 DNS-polimerázt alkalmazunk. Ennek a két enzimnek az alkalmazása Maniatis és munkatársainak korábban idézett munkájában a 113–121. oldalon van leírva.

C. *Agarózgél-elektroforézis és a DNS-fragmentumok tisztítása gélekről*

Agarózgél-elektroforézist hajtunk végre vízszintes berendezésben, amely Maniatis és munkatársai korábban idézett munkájának 150–163. oldalán van leírva. Az alkalmazott puffer az ott leírt trisz-borát-puffer. A DNS-fragmentumokat 0,5 μg/ml etidium-bromiddal végzett festéssel tesszük láthatóvá, amely vagy jelen van a gélben és a tartálypufferben az elektroforézis során, vagy az elektroforézist követően adjuk hozzá. A DNS-t rövid hullámhosszúságú vagy hosszú hullámhosszúságú ultraibolya fénnyel végzett megvilágítással tesszük láthatóvá. Amikor a fragmentumokat izolálni akarjuk a gélről, az alkalmazott agaróz kis kocsonyásodási hőmérsékletű változat, amelyet a Sigma Chemicaltól (St. Louis, Missouri) szerzünk be. Elektroforézis után a kívánt fragmentumot kimetsszük, műanyag csőbe helyezzük, 65 °C hőmérsékleten melegítjük mintegy 15 percen át, majd háromszor extraháljuk fenollal, és kétszer kicsapjuk etanollal. Ez az eljárás kissé módosított változata annak az eljárásnak, amelyet Maniatis és munkatársai korábban idézett munkájuk 170. oldalán leírtak.

D. *Szintetikus kapcsoló (linker) fragmentumok hozzáadása a DNS-végekhez*

Amikor kívánatos lenne új restrikciós endonukleáz helyet adni a DNS-molekula végéhez, ezt a moleklát először DNS-polimerázzal kezeljük, hogy egy síkban lévő végeket alkossunk meg, ha szükséges, amint ezt a fentebbi fejezetben leírtuk. Ebből a fragmentumból mintegy 0,1–1,0 μg-ot, előnyösen 0,5 μg-ot adunk mintegy 100 ng foszforilezett kapcsoló DNS-hez, amelyet a New England Biolabstól kaptunk, 20–30 μl, előnyösen 20 μl térfogatban, amely 2 μl T4 DNS ligázt (a New England Biolabstól) és 1 mmol/l ATP-t tartalmaz a gyártó által ajánlott pufferben. Egy éjszakán át 15 °C hőmérsékleten végzett inkubálás után a reakciót leállítjuk olyan módon, hogy a keveréket 10 percen át melegítjük 65 °C hőmérsékleten. A reakciókeveréket ezután mintegy 100 μl-re hígítjuk olyan pufferrel, amely alkalmas ahhoz a restrikciós endonukleázhoz, amely hasít a szintetikus kapcsoló szekvenciánál, és mintegy 50–200, előnyösen 100 egységet adunk hozzá ebből az endonukleázból. A keveréket megfelelő hőmérsékleten inkubáljuk 2–6, előnyösen 4 órán át, majd a fragmentumot agarózgél-elektroforézisnek vetjük alá, és a fragmentumot tisztítjuk olyan módon, ahogyan azt a fentebbiekben leírtuk. Az így létrejött fragmentum most olyan végekkel bír, amelyeket a restrikciós endonukleázzal végzett emésztés kialakított. Ezek a végek általában kohezívek, úgyhogy a létrejött fragmentumot most könnyen ligáljuk más olyan fragmentumokhoz, amelyek ugyanezekkel a kohezív végekkel rendelkeznek.

E. *Az 5'–terminális foszfátok eltávolítása a DNS-fragmentumokról*

A plazmid klónozási lépések során a vektor plazmid kezelése foszfatázokkal csökkenti a vektor recirkularizálódását (ezt Maniatis és munkatársai korábban idézett munkájukban a 13. oldalon tárgyalják). A DNS emésztése után a megfelelő restrikciós endonukleázzal egy egység borjúbél alkálikus foszfatázt, amelyet a Boehringer–Mannheimtől (Indianapolis, IN) szerzünk be, adagolunk. A DNS-t 37 °C hőmérsékleten inkubáljuk egy órán át, majd kétszer extraháljuk fenollal, és kicsapjuk etanollal.

F. *A DNS-fragmentumok ligálása*

Amikor komplementer kohezív végekkel rendelkező fragmentumokat akarunk egyesíteni, az egyes fragmentumokból mintegy 100 ng-ot inkubálunk 20–40 μl, előnyösen 30 μl reakciókeverékben, amely mintegy 0,2 egység T4 DNS-ligázt tartalmaz (New England Biolabs terméke) a gyártó által javasolt pufferben. Az inkubálást 1–20, előnyösen 8 órán át végezzük 15 °C hőmérsékleten. Amikor egy síkban lévő végekkel rendelkező DNS-fragmentumokat egyesítünk, ezeket ugyanúgy inkubáljuk, mint fent, azzal a kivétellel, hogy a T4 DNS-ligáz mennyiségét 2 egységről 4 egységre növeljük.

G. *DNS transzformálása E. coliba*

E. coli HB101 törzset (DSM, Braunschweig, NSZK; DSM 1607) alkalmazunk a legtöbb kísérletben. A DNS-t E. coliba a kalcium-kloridos eljárást alkalmazva vezetjük be, amelyet Maniatis és munkatársai fentebb idézett munkájukban a 250–251. oldalon írtak le.

H. *E. coli átvizsgálása plazmidokra*

A transzformálást követően az E. coli így létrejött telepeit átvizsgáljuk a kívánt plazmid jelenlétére gyors plazmid izolálási eljárással. Két kényelmes eljárást írnak le Maniatis és munkatársai fentebb idézett munkájuk (1982) 366–369. oldalain.

I. *Plazmid DNS nagyléptékű izolálása*

Plazmidok nagy mennyiségének izolálási eljárása E. coliban Maniatis és munkatársainak fentebb idézett munkájukban, a 88–94. oldalon található.

J. *Klónozás M13 fág vektorokba*

Az ezután következő leírásban meg lehet érteni, hogy az M13-származékok kettős szálú replikatív formáját alkalmazzuk olyan rutinműveletekhez, mint a restrikciós enzimes emésztés, ligálás stb.

5. példa. Kiméra gén megalkotása pBR322-ben

Abból a célból, hogy fuzionáljuk a CaMV VI. gén promotort és protoxin kódolószekvenciákat, mp19 fág vektor [Yanisch-Perron és munkatársai (1985)] származékot alkotunk meg. Először egy, mintegy 155 nukleotidot 5' irányban a protoxin kódolóterület felé tartalmazó DNS-fragmentumot és a kódolószekvencia szomszédos, mintegy 1346 nukleotidját iktatjuk be mp19-be. mp19 ds rf (kettős szálú replikatív formájú) DNS-t emésztünk SacI és SmaI restrikciós endonukleázokkal, és a mintegy 7,2 kb-s vektor fragmentumot elektroforézis után tisztítjuk kis dermedéspontú agarózon, standard eljárásokkal.

A pKU25/4 plazmidban jelen lévő protoxin gén nukleotidszekvenciáját az I szekvencia mutatja be. A pKU25/4 plazmid DNS-t HpaI és SacI endonukleázokkal emésztjük, és egy 1503 bp-s fragmentumot (amely az I szekvencia 2–1505. nukleotidjait tartalmazza) a fentiek szerint tisztítjuk. (Ez a fragmentum mintegy 155 bp-t tartalmaz a bakteriális promotor szekvenciákból és mintegy 1346 bp-t a protoxin kódolószekvencia rajtjából.) Az egyes fragmentumokból azután mintegy 100 ng-ot összekeverünk, T4 DNS-ligázt adunk hozzá, és 15 °C hőmérsékleten egy éjszakán át inkubáljuk. Az így létrejött keveréket E. coli HB101 törzsbe transzformáljuk, E. coli JM101 indikátor baktériumokkal összekeverjük, és szélesztjük, amint ezt Messing J. leírta [Meth. Enzymol., *101*, 20 (1983)]. Egyik fágot, amelyet mp19/bt-nek nevezünk, alkalmazzuk az alábbi további konstrukciókhoz.

Ezután a CaMV VI. gén promotort és a VI. gén néhány kódolószekvenciáját beiktatjuk mp19/bt-be. mp19/bt ds rf DNS-t emésztünk BamHI-gyel, kezeljük DNS-polimeráz nagy fragmentummal, hogy egy síkban lévő végeket alkossunk meg, és újból hasítunk PstI endonukleázzal. A nagy vektorfragmentumot elektroforézissel tisztítjuk, amint ezt fentebb leírtuk. A pABD1 plazmidot Paszkowski és munkatársai írták le [EMBO J., *3*, 2717–2722 (1984)]. PABD1 plazmid DNS-t emésztünk PstI-gyel és HindIII-mal. A mintegy 465 bp hosszúságú, CaMV VI. gén promotort és a VI. gén kódolóterületéből mintegy 75 bp-t tartalmazó fragmentumot tisztítjuk. A két fragmentumot ligáljuk, és szélesztjük, amint ezt fentebb leírtuk. Az így létrejött rekombináns fágok egyikét, amelyet mp19/btca-nak nevezünk, alkalmazzuk a következő kísérletekben.

Az mp19/btca fág tartalmazza a CaMV VI. gén promotor szekvenciákat, a VI. gén kódolószekvencia egy részét, mintegy 155 bp-t a Bacillus thüringiensis DNS-ből a protoxin kódolószekvenciától fölfelé és a protoxin kódolószekvencia mintegy 1346 bp-ját. Hogy a CaMV promotor szekvenciákat pontosan fuzionáljuk a protoxin kódolószekvenciákhoz, a közbelépő DNS-t kiiktatjuk, az mp19/btca DNS oligonukleotid irányított mutagenezisét alkalmazva. Egy (5')TTCGGATTGTTATCCATGGTTGGAGGTCTGA(3') szekvenciájú DNS oligonukleotidot szintetizálunk rutineljárásokkal, Applied Biosystems DNS Synthesizer berendezést alkalmazva. Ez az oligonukleotid komplementer az mp13/btca DNS fágban lévő olyan szekvenciákkal komplementer, amelyek a CaMV promotor [Hohn (1982) munkája, lásd az előbbi idézetet, szerinti 5762–5778. nukleotidok] 3'-végénél és a protoxin kódolószekvencia kezdeténél vannak (156–172. nukleotidok) a fenti I képletben. Az általános eljárás mutagenezishez az, amelyet Zoller és Smith írtak le, lásd az előbbi idézetet (1983). Mintegy 5 μg egyszálú mp19/btca DNS-t összekeverünk 0,3 μg foszforilezett oligonukleotiddal 40 μl térfogatban. A keveréket 65 °C hőmérsékleten melegítjük 5 percen át, majd lassan lehűtjük 4 °C hőmérsékletre. Ezután puffert, nukleotid-trifoszfátokat, ATP-t, T4 DNS ligázt és DNS-polimeráz nagy fragmentumát adjuk hozzá, és inkubálunk egy éjszakán át 15 °C hőmérsékleten, amint ezt Zoller és Smith leírták. Gélelektroforézis után kör alakú kettős szálú DNS-t tisztítunk, és átfertőzzük E. coli JM101 törzsbe. Az így létrejött tarfoltokat átvizsgáljuk olyan szekvenciákra, amelyek hibridizálnak ^{32}P-jelzett oligonukleotiddal, és a fágot DNS restrikciós endonukleázos analízissel elemezzük. Az így létrejövő fág klónok között vannak olyanok, amelyekben ki vannak iktatva a nem kívánt szekvenciák a CaMV VI. gén promotor és a protoxin kódolószekvencia között. Ezt a fágot mp19/btca/del-nek nevezzük.

Ezután olyan plazmidot alkotunk meg, amelyben a protoxin gén 3' kódolóterülete CaMV átírás terminációs szignálokhoz van fuzionálva. Először a pABD1 plazmid DNS-t emésztjük BamHI és BglII endonukleázokkal, és egy 0,5 kb-s, a CaMV átírás terminációs szekvenciát tartalmazó fragmentumot izolálunk. Ezután pUC19 plazmidot [Yanisch-Perron és munkatársai: Gene, *33*, 103–119 (1985)] emésztünk BamHI-gyel, összekeverjük a 0,5 kb-s fragmentummal, és inkubáljuk T4 DNS ligázzal. A DNS transzformálása után E. coli HB101 törzsbe, az így létrejövő klónok egyikét, amelyet p702 plazmidnak nevezünk, kinyerjük.

Ezután a p702 plazmid DNS-t elhasítjuk SacI és SmaI endonukleázokkal, és a nagyobb, mintegy 3,2 kb-s fragmentumot gélelektroforézissel izoláljuk. PKU25/4 plazmid DNS-t emésztünk AhaIII és SacI endonukleázokkal, és a 2,3 kb-s fragmentumot (1502–3773. nukleotidok a fenti I képletben), amely a protoxin kódolószekvencia 3' részét (az 1504–3773. szekvenciákat az I képlet szerint) tartalmazza, gélelektroforézis után izoláljuk. Ezt a két DNS-fragmentumot összekeverjük, inkubáljuk T4 DNS ligázzal, és E. coli HB101 törzsbe transzformáljuk. Az így létrejött plazmid a p702/bt.

Végül az mp19/btca/del fág ds rf ND-ének részleteit és p702/bt plazmidot egyesítjük, hogy olyan plazmidot alkossunk meg, amely a protoxin kódolószekvenciát tartalmazza CaMV promotorral és terminátor-szekvenciákkal szegélyezve. Az mp19/btca/del fág DNS-t SacI és SphI endonukleázokkal emésztjük, és egy mintegy 1,75 kb-s fragmentumot tisztítunk agarózgél-elektroforézist követően. Hasonlóképpen p702/bt plazmid DNS-t emésztünk SacI és SalI endonukleázokkal, és egy mint-

egy 2,5 kb-s fragmentumot izolálunk. Végül pBR322 plazmid DNS-t [Bolivar és munkatársai (1977)] emésztünk SalI-gyel és SphI-gyel, és a nagyobb, 4,2 kb-s fragmentumot izoláljuk. Mind a három DNS-fragmentumot összekeverjük, és inkubáljuk T4 DNS-ligázzal, és E. coli HB101 törzsbe transzformáljuk. Az így létrejött plazmid, a pBR322/bt14 a pBR322 származéka, amely tartalmazza a CaMV VI. gén promotort és a transzlációs start szignált a Bt kristályos fehérje kódolószekvenciához fuzionálva; ezt követi a CaMV átírási termináció.

6a példa. A pTOX megalkotása, amely Bacillus thüringiensis var. tenebrionis inszekticid toxin gént kódoló kiméra gént tartalmaz

Egy olyan gént, amely a Bacillus thüringiensis var. tenebrionis inszekticid kristályos fehérje génjét kódolja, már jellemeztek, és szekvenciáját leírták [Sekar V. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USSA, *84*, 7036–7040 (1987)]. Ezt a kódolószekvenciát valamely előnyös restrikciós fragmentumként izoláljuk, például egy mintegy 3 kb méretű HindIII fragmentumként, és megfelelő növényi kifejezővektorba, például pCIB770 plazmidba [Rothstein S. és munkatársai: Gene, *53*, 153–161 (1987)] iktatjuk be. A pCIB770 plazmid tartalmaz egy kiméra kanamicin gént növényekben való kifejezéshez, valamint tartalmazza a CaMV (karfiol-mozaikvírus) 35S RNS átiratának promotorát és terminátorát, egy egyedi BamHI hellyel elválasztva. A BamHI/HindIII linker két oligonukleotidból –GATCCAGTGC TCGA és AGCTTCGAGCACTG– épül fel, és ezek összeillesztése szolgáltatja a GATCCAGTGC TCGA

GTCACG AGCTTCGA linkert.

A toxint kódoló szekvenciát hordozó restrikciós fragmentumot kompatíbilissé tesszük az idézett irodalmi hely szerint pCIB770 egyedi BamHI helyéhez megfelelő molekuláris adapter alkalmazásával, és együtt ligáljuk ezeket.

6b példa. pSAN megalkotása, amely a Bacillus thüringiensis san diego törzs inszekticid toxin génjét kódoló kiméra gént tartalmazza

A Bacillus thüringiensis san diego törzs inszekticid fehérjéjét kódoló gént Herrnstadt és munkatársai jellemezték és írták le szekvenciáját (EP–O–202–739 és EP–O–213–818). Ezt a kódolószekvenciát előnyösen restrikciós fragmentumok formájában izoláljuk, és beiktatjuk megfelelő növényi kifejezővektorba, például pCIB770-be. A pCIB770 plazmid tartalmaz egy kiméra kanamicin gént növényekben való kifejezéshez, valamint tartalmazza a CaMV (karfiol-mozaikvírus) 35A RNS átiratának promotorját és terminátorját egyedi BamHI hellyel elválasztva. A toxin kódolószekvenciát viselő restrikciós fragmentumot kompatíbilissé tesszük a pCIB770 egyedi BamHI helyéhez a megfelelő molekuláris adapter alkalmazásával, és együtt ligáljuk.

7a példa. pCIB710 plazmid megalkotása

A pLW111 plazmid a karfiol-mozaikvírus (CaMV) BJI törzsének [Franck és munkatársai: Cell, *21*, 285–294 (1980)] három kisebb EcoRI fragmentumát tartalmazza a pMB9-be klónozva. A pLW111-et BglII-vel emésztjük, és egy 1149 bp-s szekvenciát izolálunk; ez megfelel a 6494–7643. számú bázispárnak, melyet Hohn és munkatársai állítottak elő [Current Topics in Microbiology and Immunology, *96*, 193–236 (1982)]. A fragmentum szerkezetét a 23. ábra mutatja be. Ezt a fragmentumot pUC19 BamHI helyébe ligáljuk. Ez a restrikciós fragmentum kódolja mind a CaMV 35S RNS-hez tartozó promotort, mind a poliA hozzátett jelet (vagyis a terminátort) ehhez az átirathoz.

In vitro mutagenezis

Egy egyedi BamHI helyet iktatunk be e közé a promotor és terminátor közé in vitro mutagenezis segítségével. Ehhez egy 36 bázisos oligonukleotidot szintetizálunk, amely azonos a CaMV szekvenciával ebben a területben, azzal a különbséggel, hogy egy BamHI restrikciós hely van beiktatva a szekvenciába a 7483. számú bázispárnál. Az oligonukleotid alkalmazásával a PLW111 plazmidból kapott, 1155 bázispárral rendelkező mutáns fragmentumot a 24. és 25. ábra mutatja be.

A fentiek szerint kialakított 1149 bp-s BglII fragmentumot M13mp19-be klónozzuk, és egyszálú fág DNS-t izolálunk.

Ezt az egyszálú DNS-t összeforrasztjuk a szintetikus oligonukleotiddal, egy új szálat szintetizálunk az oligonukleotidot alkalmazva primerként, és a DNS-t JM101 törzsbe fertőzzük át [Zoller és Smith, DNA, *3*, 479–488 (1984)].

A beiktatott BamHI hellyel rendelkező M13 fágot úgy izoláljuk, ahogyan ezt Zoller és Smith fentebb idézett munkájukban leírták.

A kívánt mutáns fág kiválasztása

A 36 bázisos oligonukleotidot kinázos kezeléssel jelezzük 32-P-ATP jelenlétében. Ez az oligonukleotid a következő DNA-szekvenciával azonos:

TCTATCTCTCTCTATAAGGATCCTAATGTGTGAGTA.

Az átfertőzött M13 fág tarfoltok készletét nitrocellulóz szűrőn lokalizáljuk. Ezt a szűrőt hibridizáljuk a jelzett 36-merrel. A szűrőt növelt hőmérsékleten mossuk. A mutált fágok magasabb mosási hőmérsékleten stabilak (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., p. 4.39–4.43, 1989).

Ezeknek a magasabb hőmérsékleten stabil fágoknak egyikét izoláljuk, és szekvenciaelemzésnek vetjük alá, hogy bebizonyítsuk a BamHI hely jelenlétét.

A pCIB710 végső összeállítása

Az ebből a fából izolált kettős szálú DNS-t HindIII-mal és EcoRI-gyel emésztjük. pUC19-et hasítunk HindIII-mal és EcoRI-gyel. Ezt a két emésztett DNS-t ligáljuk. Transzformánsokat szelektálunk ampicillin rezisztencia alapján. Ebből a ligálásból származó egyik transzformáns a pCIB710 plazmid.

A pCIB710 plazmidnak nincs ATG start kodonja azon BamHI hely, amelyet beiktattunk, és az átírás kiindulási pontja között.

7b példa. pCIB712 megalkotása

A higromicin rezisztencia gén [Gritz L. és Davies J.: Gene, *25*, 179–188 (1983)] egy mintegy 1150 bázispáros, a pLG90 plazmidból származó BamHI fragmentumon van jelen. A higromicin rezisztencia gén forrása-

ként a pLG90 plazmidot használtuk fel. Ezt a plazmidból egy 1150 bp nagyságú BamHI fragmentumként izoláltuk, majd beiktatjuk a pCIB710 plazmidba a pCIB712 plazmid előállítására. A pCIB712 plazmidot az ATCC-nél (Rockville, Maryland) deponáltuk, 67404 deponálási számon. Ezt a deponálást a Budapesti Szerződéssel összhangban végeztük (a deponálás dátuma: 1987. május 18.).

A pCIB712 plazmidot megfelelő enzimet alkalmazva linearizáljuk, például SmaI-gyel.

7c példa. pCIB10/35SBt megalkotása

A pCIB710 plazmidot fentebb írtuk le.

A pCIB10 megalkotása (a jelölést illetően is lásd a 7a–7g ábrákat)

15. Egy, a pTiT37-ből származó bal határterületet tartalmazó T-DNS-fragmentumot izolálunk pBR325 (EcoRI29-ből) [Yadav és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *79*, 6322–6326 (1982)]. A pBR325(EcoRI29)-t EcoRI-gyel hasítjuk, és az 1,1 kb-s fragmentumot összekapcsoljuk HindIII kapcsolókkal (New England Biolabs). A pBR325(EcoRI29) EcoRI29 komponens a PTiT37 EcoRI-vel végzett lebontásával kapott 29. számú EcoRI fragmentum, amelyet a továbbiakban a pBR325. EcoRI helyére klónozunk be.

16. A pBR322 plazmidot [Bolivar és munkatársai: Gene, *2*, 95–103 (1977)] HindIII-mal hasítjuk.

17. A 15. lépésben leírt, bal határterületet tartalmazó fragmentumot a pBR322 HindIII emésztésével kapott termékbe ligáljuk.

18. A 17. lépésben megalkotott, bal határterületet tartalmazó plazmidot ClaI-gyel és HindIII-mal hasítjuk, és az 1,1 kb-s HindIII/ClaI fragmentumot izoláljuk [Hepburn és munkatársai: J. Mol. Appl. Genet., *2*, 315–329 (1983)].

19. A pUC18 plazmidot [Norrander és munkatársai: Gene, *26*, 101–106 (1983)] HindIII-mal és EcoRI-gyel hasítjuk; a 60 bp-s polilinkert végjelezzük T4 polinukleotid kinázt és gamma-^{32}P-dATP-t alkalmazva, és izoláljuk akrilamid gélről.

20. A pBR322 plazmidot EcoRI-gyel és ClaI-gyel hasítjuk, és a nagy fragmentumot izoláljuk.

21. A 60 bp-s HindIII/EcoRI polilinkert és az EcoRI29 1,1 kb-s HindIII/ClaI fragmentumot ligáljuk ClaI-gyel és EcoRI-gyel hasított pBR322-be, így alkotva meg a pCIB5-öt.

22. Kanamicin rezisztenciát (nos-neo) átadó kiméra gént állítunk elő Bin6-ból [Beven et al.: Nuc. Acid. Res., *12*, 8711–8721 (1984)], SalI/EcoRI fragmentumként. A Bin6 T-DNS térképét, amely a SalI/EcoRI fragmentum előállításához felhasznált SalI és EcoRI hely helyzetét mutatja be, a 26. ábra szemlélteti.

23. A pUC18 plazmidot EcoRI-gyel és SalI-gyel hasítjuk.

24. A 22. lépés kiméra génjét tartalmazó SalI/EcoRI fragmentumot EcoRI-gyel és SalI-gyel hasított pUC18-ba ligáljuk.

25. A BamHI felismerő helyet ennek a kiméra génnek a terminációs szekvenciájában elroncsoljuk BamHI-gyel végzett hasítással, betöltjük T4 DNS-polimerázt alkalmazva, és ligáljuk.

26. Az így létrejött plazmidot SstII-vel (Bethesda Research Laboratories) és HindIII-mal hasítjuk.

27. Egy, a pTiI37 nos promotorjának 5' részét és a jobb határterületét tartalmazó fragmentumot izolálunk olyan módon, hogy a pBR325(Hind23)-t elhasítjuk HindIII-mal és SstII-vel, és az 1,0 kb-s fragmentumot izoláljuk.

28. Ezt az 1,0 kb-s HindIII/SstII fragmentumot a 26. lépés pUC18 vektorjába ligáljuk, így alkotva meg a pCIB 4-et.

29. Egy bal oldali T-DNS-határterületet tartalmazó pCIB5-öt hasítunk AatII-vel, és tompa végűvé tesszük T4 DNS-polimerázzal végzett kezeléssel.

30. A pCIB4-et HindIII-mal hasítjuk, tompa végűvé tesszük E. coli DNS-polimeráz I Klenow-fragmentumot alkalmazó kezeléssel, és EcoRI-gyel hasítjuk.

31. A 29. lépés vektorát ligáljuk a 30. lépés nagy fragmentumával, így alkotva meg a pCIB2-t, egy ColE1 replikont, amely tartalmazza a jobb és bal T-DNS határterületeket egy kiméra Km^2 génnel és egy polilinkerrel szegélyezve.

32. A pRZ102 plazmidot [Jorgensen és munkatársai: Mol. Gen. Genet., *177*, 65–72 (1979)] emésztjük BamHI-gyel, és betöltjük Klenowot alkalmazva.

33. pA03 [Oka és munkatársai: Nature, *276*, 845–847 (1978) és Oka és munkatársai: J. Mol. Biol., *147*, 217–226 (1981)] részleges AluI emésztését végezzük el.

34. Az AluI emésztésének termékét a 32. lépés szerint hasított pRZ102-be ligáljuk, a kívánt transzformánsokat kanamicinre való rezisztencia alapján szelektálva.

35. Az így létrejött plazmid a Tn903 kódolószekvenciájával rendelkezik, amely egy 1,05 kb-s BamHI fragmentumon van jelen; ezt a fragmentumot BamHI emésztés és Klenowval végzett betöltés után izoláljuk.

36. A pRK252 plazmidból, a széles gazdaszervezet-tartományú pRK2 származékából hiányzik az a BglII hely, amely a szülő pRK290 plazmidban jelen van [Ditta és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *77*, 262–269 (1980)]. A pRK 252-t SmaI-gyel és SalI-gyel emésztjük, Klenowot alkalmazva betöltjük, és ebből az emésztési termékből a nagy fragmentumot izoláljuk. A pRK252 plazmid közti termék, amelyet a pCIB10/19SBt előállítására (7a példa, C rész) használtunk fel. Ez utóbbit az ATCC-nél 67330 számon helyeztük letétbe, tehát az a köz számára hozzáférhető.

37. A TN903-at tartalmazó, 35. lépésben izolált fragmentumot ligáljuk a pRK252-ből származó nagy fragmentumba, így alkotva meg a pRK252 Km-et.

38. A pRK252 plazmidot EcoRI-gyel hasítjuk, Klenowot alkalmazva tompa végűvé tesszük, és BglII kapcsolókkal (New England Biolabs) kapcsoljuk össze.

39. A pCIB2 plazmidot EcoRV-tel hasítjuk, és BglII kapcsolókkal (New England Biolabs) kapcsoljuk össze.

40. A 39. lépés szerinti BglII-vel kapcsolt pCIB2-t a 38. lépés szerinti vektorba ligáljuk, így alkotva meg a pCIB10-et.

7d példa. pCIB10a megalkotása

A 7c példát ismételhetjük meg a pRK290 plazmidot alkalmazva pRK252 helyett (7f–g ábra).

41. A pRZ102 plazmidot [Jorgensen és munkatársai (1979), fentebb idézett munka] emésztjük BamHI-gyel, és betöltjük Klenowot alkalmazva.
42. A pA03 plazmid [Oka és munkatársai (1978) fentebb idézett munka] részleges AluI emésztését végezzük el.
43. Az AluI emésztés termékét a 32. lépés szerint hasított pRZ102-be ligáljuk, és a kívánt transzformánsokat kanamicinre való rezisztencia alapján szelektáljuk.
44. Az így létrejövő plazmid egy 1,05 kb-s BamHI fragmentumon jelenlévő Tn903 kódolószekvenciával rendelkezik; ezt a fragmentumot BamHI emésztés és Klenowval végzett betöltés után izoláljuk.
45. A pRK290 plazmidot SmaI-gyel és SalI-gyel emésztjük, Klenowot alkalmazva betöltjük, és az ebből az emésztési termékből a létrejött nagy fragmentumot izoláljuk.
46. A 35. lépés szerint izolált, Tn903-at tartalmazó fragmentumot a pRK290-ből származó nagy fragmentumba ligáljuk, így alkotjuk meg a pRK290 Km-et.
47. A 46. lépésben kapott plazmidot BglII-vel emésztjük, Klenow alkalmazásával betöltjük, és ligáljuk – elroncsolva a BglII helyet – a pRK290 előállítására.
48. A pRK290 Km plazmidot elhasítjuk EcoRI-gyel, Klenowot alkalmazva tompa végűvé tesszük, és összekapcsoljuk BglII kapcsolókkal (New England Biolabs).
49. A pCIB2 plazmidot EcoRV-tel hasítjuk, és összekapcsoljuk BglII kapcsolókkal (New England Biolabs).
50. A 39. lépés szerinti, BglII-vel kapcsolt pCIB2-t a 47. lépés szerinti vektorba ligáljuk, így alkotva meg a pCIB10a-t.

7e példa. Bacillus thüringiensis protoxin kiméra gén megalkotása a CaMV 35S promotorral

A. *CaMV 35S promotor kazetta megalkotása*

A pCIB710 plazmidot úgy alkotjuk meg, ahogyan a 10. ábrában bemutatjuk. Ez a plazmid tartalmaz CaMV promotort és 35S RNS-átirathoz szolgáló átírás terminációs szekvenciákat [Covey S. N., Lomonosoff G. P. és Hull R.: Nucleic Acids Research, *9*, 6735–6747 (1981)]. A CaMV DNS egy 1149 bp-s BglII restrikciós fragmentumát [Hohn és munkatársai szerint (1982) a 7643–6494 bp között] izoláljuk a pLV111 plazmidból, de egy másik módszer szerint a fragmentumot közvetlenül lehet izolálni CaMV DNS-ből preparatív gélelektroforézissel, ahogyan ezt korábban leírtuk, és összekeverjük BamHI-gyel hasított pUC19 plazmid DNS-sel, T4 DNS-ligázzal kezeljük, és E. coli-ba transzformáljuk. (Meg kell jegyeznünk, hogy a BamHI restrikciós hely elroncsolódik a BglII kohezív végeknek BamHI kohezív végekhez való ligálásával.) Az így létrejövő plazmidot, amelyet pUC19/35S-nek nevezünk, alkalmazzuk azután oligonukleotid-irányított in vitro mutagenezishez, hogy a GGATCC BamHI felismerő szekvenciát beiktassuk közvetlenül a CaMV 7483. nukleotidja után (Hohn számozása szerint). Az így létrejövő plazmid, a pCIB710 tartalmazza a CamV 35S promotor területet és átírás terminációs területet egy BamHI restrikciós hellyel elválasztva. Az ebbe a BamHI helybe beiktatott DNS-szekvenciákat növényekben fejezhetjük ki ezekkel a CaMV átírásszabályozó szekvenciákkal. (Azt is meg kell jegyeznünk, hogy a pCIB710 nem tartalmaz semmiféle ATG transzlációs kodont az átírás rajtja és a BamHI hely között.)

B. *CaMV 35S promotor/terminációs kazetta beiktatása pCIB10-be*

A következő lépéseket a 11. ábra körvonalazza. A pCIB10 és pCIB710 DNS-eket EcoRI-gyel és SalI-gyel emésztjük, összekeverjük, és ligáljuk. Az így létrejövő plazmid, a pCIB10/710 rendelkezik a CaMV35S promotor/terminátor kazettával a pCIB10 növény transzformációs vektorba beiktatva. A CaMV 35S szekvenciák a pCIB10-en lévő T-DNS-határterületek között vannak, és így beiktathatók növény genomokba a növény transzformációs kísérletekben.

C. *Bacillus thüringiensis protoxin gén beiktatása pCIB10/710-be*

Az alábbi lépéseket a 12. ábrában körvonalazzuk. A pCIB10/19SBt plazmidot, mint a protoxin gén forrását, BamHI-gyel és NcoI-gyel emésztjük, és a protoxin gént tartalmazó 3,6 kb-s fragmentumot preparatív gélelektroforézissel izoláljuk. A fragmentumot azután összekeverjük az 5'–CATGGCCGGATCCGGC–3' szekvenciájú szintetikus NcoI–BamHI adapterrel, majd BamHI-gyel emésztjük. Ez a lépés BamHI kohezív végeket hoz létre a protoxin fragmentum mindkét végén. Ezt a fragmentumot azután BamHI-gyel hasított pCIB10/710-be iktatjuk. Az így létrejött plazmid, a pCIB10/35SBt, amelyet a 12. ábrában mutatunk be, tartalmazza a protoxin gént a CaMV 35S promotor és az átírás terminációs szekvenciák között.

A pCIB10/19SBt plazmidot (E. coli HB101 törzsben) deponáltuk az ATCC-nél, ahol az ATCC 67330 deponálási számot kapta (a deponálás dátuma: 1987. február 27.).

A pCIB10/35SB-t (MC1061 törzsben) az ATCC-nél (Rockville, Maryland) deponáltuk, ahol ez a 67329 deponálási számot kapta. Ezt a deponálást a Budapesti Szerződés igényeivel összhangban végeztük (a deponálás dátuma: 1987. február 27.).

8a példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A hősokk kivételével minden lépést szobahőmérsékleten hajtunk végre. A protoplasztokat, amelyeket a 3. példa utolsó lépésében kaptunk, újra szuszpendáljuk 0,1% (tömeg/térfogat) MES-t és 6 mmol/l $MgCl_2$-t tartalmazó 0,5 mol/literes mannitoldatban. Ennek a szuszpenziónak az ellenállását Dialog Electroporator^R kamrájában mérjük, és 1–1,2 kohm-ra állítjuk be, 300 mmol/l $MgCl_2$-oldatot alkalmazva. A protoplasztokat hővel sokkoljuk olyan módon, hogy a mintát tartalmazó csövet 45 °C hőmérsékletű vízfürdőbe merítjük 5 percre, ezt követi a lehűtés szobahőmérsékletre jégen. Ennek a szuszpenziónak 0,25 ml-es alikvotjaihoz a higromicin rezisztencia gént tartalmazó, linearizált pCIB712 plazmid 4 μg-ját adjuk, és 20 μg borjútímuszt hordozó DNS-t is adunk hozzá.

A protoplasztokhoz 0,125 ml 24%-os (tömeg/térfogat) polietilénglikol (PEG) oldatot (a PEG molekulatömege 8000) adunk, 30 mmol/l $MgCl_2$-t tartalmazó 0,5 mol/literes mannitoldatban. A keveréket alaposan,

de óvatosan összekeverjük, és 10 percen át inkubáljuk. A mintát az elektroporátor kamrájába visszük át, és háromszor pulzáljuk 10 másodperces intervallumoknál 1000, 1200, 1500, 1800, 2300 és 2800 V/cm^{-1} kiindulási feszültségeknél, és 10 mikroszekundumos (μsec) impulzusok exponenciális csillapítási idejével.

A protoplasztokat a következőképpen tenyésztjük:

A mintákat 6 cm átmérőjű Petri-csészére helyezzük szobahőmérsékleten. További 5–15 perc múlva 3 ml KM tápközeget adunk hozzá, amely tartalmaz még 1,2% (tömeg/térfogat) SeaPlaque^{R} agarózt, 1 mg/liter 2,4-D-t és 100 mg/liter O-acetil-szalicilsavat. Az agarózt és a protoplasztokat alaposan összekeverjük, és a tápközeget hagyjuk megdermedni.

8b példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy a protoplasztkészítmény ellenállását 0,5–0,7 kohmra állítjuk be.

8c példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy PEG-ként 4000 molekulatömegű PEG-et alkalmazunk.

8d példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8c példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy a protoplasztkészítmény ellenállását 0,5–0,7 kohmra állítjuk be.

8e példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy PEG-et nem alkalmazunk.

8f példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8b példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy PEG-et nem alkalmazunk.

8g példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy fél térfogat 12%-os (tömeg/térfogat) PEG-et adunk hozzá.

8h példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8b példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy fél térfogat 12%-os (tömeg/térfogat) PEG-et adunk hozzá.

8i példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8c példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy fél térfogat 12% (tömeg/térfogat) PEG-et adunk hozzá.

8j példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8d példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy fél térfogat 12%-os (tömeg/térfogat) PEG-et adunk hozzá.

8k példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8j példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy az impulzusokat 3 másodperces intervallumokkal alkalmazzuk.

8l példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8h példák bármelyikét ismételjük, ahol a protoplasztokat az elektroporáció után olyan lemezekre helyezzük, amelyek egy 16 °C hőmérsékletre hűtött lapon vannak elhelyezve.

8m példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8l példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy a protoplasztokat csövekbe helyezzük az elektroporációs lépés után, és 10 ml 6/7 erősségű KMC-oldattal (6 rész KMC-törzsoldat+1 rész víz) mossuk, 60 g-nél 10 percen át végzett centrifugálással összegyűjtjük, újra szuszpendáljuk 0,3 ml KM-tápközegen, és lemezre visszük, mint a 8a példában.

8n példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8m példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy a protoplasztok mosásához használt tápközeg W5-oldat (380 mg/liter KCl, 18,375 g/liter $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 9 g/liter NaCl, 9 g/liter glükóz, pH 6,0).

8o példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8n példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy a protoplasztok lemezre viteléhez használt tápközeg olyan KM-tápközeg, amely 30% (térfogat), 30 mol/liter Dicamba^{R}-t magában foglaló Schenk- és Hildebrandt-tápközeget (1972) is tartalmaz, és amelyben előzőleg Dactylis glomerata sejtszuszpenziója nőtt.

8p példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8n példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy a protoplasztok lemezre viteléhez alkalmazott tápközeg olyan KM-tápközeg, amely 15% (térfogat), 30 mol/liter Dicamba^{R}-t magában foglaló Schenk- és Hildebrandt-tápközeget [Can J. Bot., *50*, 199–204 (1972)] is tartalmaz, és amelyben előzőleg Dactylis glomerata sejtszuszpenziója nőtt.

8q példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8n példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy a protoplasztok lemezre viteléhez

alkalmazott tápközeg, amely 30% (térfogat) N6-tápközeget tartalmaz, és amelyben előzőleg a 3. példában leírt sejtszuszpenzió nőtt.

8r példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8n példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy a protoplasztok lemezre viteléhez alkalmazott tápközeg olyan KM tápközeg, amely 15% (térfogat) N6-tápközeget tartalmaz, és amelyben előzőleg a 3. példában leírt sejtszuszpenzió nőtt.

8s példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8r példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy a protoplasztokat tenyésztő tápközegben [0,5 mg/liter 2,4-D-t és 100 ng/liter acetil-szalicilsavat és 1,2% (tömeg/térfogat), SeaPlaque^R agarózt tartalmazó KM-tápközeg] „dajka" tenyészetszűrőre viszszük fel, 0,5 millió protoplaszt/ml sűrűséggel.

Ebben a kiviteli módban Durapore-szűrőket (katalógusszám: GVWP 04700, 0,22 μm pórusméret, 47 mm átmérő) a szélén megszámozunk ólomceruzával a felső felületén, ahogyan ezt a tárolóról eltávolítjuk. Ezt azért tesszük, hogy biztosítsuk: a felső oldal legyen felülettel felfelé a „dajka" tenyészetekben, és azt is biztosítsuk, hogy csak egy szűrőt helyezzünk egy tenyészetre. A szűrőket desztillált, ionmentesített vízben autoklávozzuk áttetsző tartályban (GA7^R vagy bármilyen hasonló tartály) 20 percen át. Amikor ezek lehűltek, a vizet folyékony KM tápközeggel helyettesítjük, amint ezt fentebb leírtuk, de gélképző szerek nélkül, legalábbis 3 órával a szűrőknek a „dajka" tenyészetekre való helyezése előttig.

A „dajka" tenyészeteket Black Mexican Sweet Corn (feteke mexikói édes kukorica) (BMS) szuszpenziós tenyészetéből készítjük [Green: Hort. Sci., *12*, 131 (1977); Smith és munkatársai: Plant Sci. Lett., *36*, 67 (1984)] vagy a 3. példában leírt embriogén szuszpenziókból.

Amikor „dajka" tenyészetként BMS-t alkalmazunk, 0,5 mg/liter 2,4-D-t és 100 mg/liter acetil-szalicilsavat [2 mg/ml, 0,1% (tömeg/térfogat) MES-t tartalmazó 2% (térfogat/térfogat) DMSO-ban (pH 6,0)] tartalmazó steril KM tápközeget adunk steril SeaPlaque^R agarózhoz, hogy az agaróz végső koncentrációja 1,2% (tömeg/térfogat) legyen. Az agaróz felolvasztására végzett melegítés után a tápközeget 44 °C hőmérsékletre hűtjük vízfürdőben, 1 ml, BMS szuszpenziós PCV-t adunk hozzá 10 ml tápközegenként, és 5 ml-es alikvotokat osztunk el 60 mm átmérőjű Petri-csészékbe. Amikor a tápközeg megdermedt, steril Durapore-szűrőt helyezünk a felületre, a számozott felülettel fölfelé.

Amikor „dajka"-ként embriogén kukoricaszuszpenziós tenyészeteket alkalmazunk, az N6-tápközeget ozmolalitásában növeljük, glükózt alkalmazva, ~530–540 mOs/kg H_2O-ra. A pH-t újra beállítjuk 6,0-ra, és a tápközeget szűrővel sterilezzük 0,2 μm-es szűrőn át. 0,5 mg/liter 2,4-D-t és 100 mg/liter acetil-szalicilsavat [2 mg/ml, 0,1% (tömeg/térfogat) MES-t tartalmazó 2% (tömeg/térfogat) DMSO-ban (pH 6,0)] adunk hozzá. A tápközeget steril SeaPlaque^R agarózhoz adjuk, hogy az agaróz 1,2% (tömeg/térfogat) végső koncentrációját érjük el. Az agaróz felolvasztására végzett melegítés után a tápközeget 44 °C hőmérsékletre hűtjük vízfürdőben, embriogén szuszpenziós PCV-t adunk hozzá 10 ml tápközegenként, és 5 ml-es alikvotokat osztunk el 60 mm átmérőjű Petri-csészékbe. Amikor a tápközeg megdermedt, steril Durapore-szűrőt helyezünk a felületre, számozott felülettel felfelé.

A protoplasztkészítményt lehűtött (44 °C), 1,2% (tömeg/térfogat) SeaPlaque^R agarózt és 0,5 mg/liter 2,4-D-t, valamint 100 mg/liter acetil-szalicilsavat tartalmazó KM tápközeggel hígítjuk olyan módon, hogy 0,5 millió protoplaszt/ml koncentrációt érjünk el. Ebből a készítményből 0,5 ml-t pipettázunk lassan az egyes szűrők felületére.

8t példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8s példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy borjútímuszt hordozó DNS-t nem alkalmazunk.

8u példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8t példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy 50 mikrogramm linearizált pCIB712 plazmidot adagolunk.

8v példa. Zea mays protoplasztok transzformálása elektroporációval

A 8a–8u példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy a pCIB712 plazmidot nem linearizáljuk.

9a példa. Zea mays protoplasztok transzformálása polietilénglikollal végzett kezeléssel

A protoplasztokat újra szuszpendáljuk a 3. példa utolsó lépése szerint 20 mM $MgCl_2$-t tartalmazó 0,5 mol/literes mannitoldatban. 45 °C hőmérsékleten 5 percen át végzett melegítéssel hősokkot alkalmazunk, amint ezt a 8a példában leírtuk. A protoplasztokat transzformáláshoz alkivotokra osztjuk centrifugacsövekben, csövenként 0,3 ml szuszpendált protoplasztot alkalmazva. A következő 10 perc során az alábbiakat adagoljuk: DNS-t (mint a 8a–8v példákban) és PEG-oldatot [40% (tömeg/térfogat) PEG 6000, 0,1 mol/liter $Ca(NO_3)_2$, 0,4 mol/liter mannit, pH 8–9 közé beállítva KOH-val], hogy a végső koncentráció 20% (tömeg/térfogat) legyen. Az alikvotokat 30 percen át inkubáljuk alkalmanként gyengéden megrázva, majd a protoplasztokat Petri-csészékbe helyezzük (0,6 ml eredeti protoplasztszuszpenzió/6 cm átmérőjű lemez), és tenyésztjük úgy, ahogyan ezt a 8a. vagy 8o–8r példákban leírtuk.

9b példa. Zea mays protoplasztok transzformálása polietilénglikollal végzett kezeléssel

A 3. példa utolsó lépésénél kapott protoplasztokat újra szuszpendáljuk 12–30 mmol/liter $MgCl_2$-t tartalmazó 0,5 mol/literes mannitoldatban, 20 millió protoplaszt/ml sűrűséggel. 45 °C hőmérsékleten 4 percen át

hősokkot alkalmazunk, amint ezt a 8a példában leírtuk. A protoplasztokat alikvotokra osztjuk szét transzformációhoz centrifugacsövekben, 0,5 ml protoplaszt/cső mennyiségben. A következő 10 perc során a következőket adjuk hozzá: DNS (mint az 5a példánál) és a PEG-oldat [PEG 8000 (Sigma vagy más egyenértékű gyártmány) 36% (tömeg/térfogat), 0,1 mol/liter $Ca(NO_3)_2$, 0,4 mol/liter mannit, 0,1% MES, három órán át a pH-t 7 és 8 közé állítva be 0,2 m-es szűrőn át sterilezett KOH-val] 18% (tömeg/térfogat) végső koncentrációra. Az alikvotokat 30 percen át inkubáljuk enyhe rázással, majd a protoplasztokat Petri-csészékre visszük át, és tenyésztjük, amint ezt a 8a–8s példákban leírtuk.

9c példa. Zea mays protoplasztok transzformálása polietilénglikollal végzett kezeléssel

A 9a és 9b példákat ismételjük meg, és a protoplasztokat mossuk a PEG-ben végzett 30 perces inkubálás után olyan módon, hogy a 8n példa W5-oldatából 0,3 ml-t adunk ötször, 2–3 perces időközönként, majd ezeket centrifugáljuk, a felülúszót eltávolítjuk, és a protoplasztokat tenyésztjük, mint a 8a–8s példákban.

9e példa. Zea mays protoplasztok transzformálása polietilénglikollal végzett kezeléssel

A 9a–9d példák bármelyikét ismételjük, azzal a módosítással, hogy a PEG végső koncentrációja 15% (tömeg/térfogat).

9f példa. Zea mays protoplasztok transzformálása polietilénglikollal végzett kezeléssel

A 9a–9e példák bármelyikét ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy a PEG végső koncentrációja 25% (tömeg/térfogat).

9g példa. Zea mays protoplasztok transzformálása polietilénglikollal végzett kezeléssel

A 9a–9d példák bármelyikét ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy a PEG végső koncentrációja 12% (tömeg/térfogat).

9h példa. Zea mays protoplasztok transzformálása polietilénglikollal végzett kezeléssel

A 9b–9f példák bármelyikét ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy a protoplasztokat KMC-sóoldattal mossuk a 8n példa szerint.

10a példa. Kallusz regenerálása protoplasztokból

A protoplasztokat agarózon tartalmazó lemezeket sötétbe, 26 °C hőmérsékletre helyezzük. 14 napon belül sejttelepek jönnek létre a protoplasztokból. A telepeket tartalmazó agarózt átvisszük egy 9 cm átmérőjű Petri-csésze felületére, amely 30 ml N6-tápközeget tartalmaz 2 mg/liter 2,4-D-vel, 0,24% (tömeg/térfogat) GelRite^R-rel megszilárdítva (2N6). A telepeket tenyésztjük, hogy kalluszt képezzenek. A kalluszt tovább tenyésztjük sötétben 26 °C hőmérsékleten, és kalluszdarabokat vetünk alá altenyésztésnek minden két hétben friss N6-tápközegen, amely 2 mg/liter 2,4-D-t tartalmaz, és amely 0,24% (tömeg/térfogat) GelRite^R-rel van szilárdítva.

10b példa. Kallusz regenerálása protoplasztokból

A „dajka" tenyészeteken lévő protoplasztokat tartalmazó lemezeket sötétbe helyezzük, 26 °C hőmérsékletre. Mintegy két héten belül telepek tűnnek fel. Ezután vagy a teljes szűrőket átvisszük egy 9 cm átmérőjű Petri-csésze felületére, amely 2 mg/liter 2,4-D-vel kiegészített és 0,24% (tömeg/térfogat) GelRite^R-rel szilárdított N6-tápközeget (2N6) tartalmaz, vagy telepeket szúrunk fel, és viszünk át egyedileg erre a tápközegre. A kalluszt, amely megjelenik, tovább tenyésztjük sötétben 26 °C hőmérsékleten, és kalluszdarabokat vetünk alá altenyésztésnek minden két hétben friss N6-tápközegen, amely 2 mg/liter 2,4-D-t tartalmaz, és amely 0,24% (tömeg/térfogat) GelRite^R-rel van szilárdítva.

11a példa. A Zea mays transzformált kalluszainak kiválasztása

A 10a és 10b példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy 50 mg/liter higromicin B-t adunk a 2N6-tápközeghez abból a célból, hogy kiválasszuk a transzformált sejteket.

11b példa. A Zea mays transzformált kalluszainak kiválasztása

A 10a és 10b példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy 100 mg/liter higromicint adunk a 2N6-tápközeghez abból a célból, hogy kiválasszuk a transzformált sejteket.

11c példa. A Zea mays transzformált kalluszainak kiválasztása

A 10a és 10b példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy 200 mg/liter higromicint adunk a 2N6-tápközeghez abból a célból, hogy kiválasszuk a transzformált sejteket.

12a példa. A növények regenerálása

Kalluszt helyezünk 2N6-ra fenntartáshoz, és 0N6-ra (N6-tápközeg hormonok nélkül), valamint N61-re (0,25 mg/liter 2,4-D+10 mg/liter kinetin), hogy beindítsuk a regenerálást. Az 0N6- és N61-tápközegen növő anyagot fényben növesztjük (16 óra naponta, 10–30 E/m²sec, fehér, fluoreszcens lámpákból). Az N61-en növekvő kalluszt 0N6-ra visszük át 2 hét után, mivel a meghosszabbított idő az N61-lemezeken káros. A kalluszt minden két hétben altenyésztésnek vetjük alá, még akkor is, ha a kalluszt ismét csak ugyanarra az összeállítású tápközegre visszük át. A csíranövények 4–8 hét múlva tűnnek fel.

Amikor a csíranövények legalább 2 cm magasak, ezeket átvisszük 0N6-tápközegre GA7 konténerekben vagy más alkalmas tenyésztőedényekben. 2–4 héten belül gyökerek fejlődnek. Amikor a gyökerek elég jól fejlettnek látszanak ahhoz, hogy támogassák a növekedést, a csíranövényeket földbe visszük át tőzeges cserepekben, fény alatt, de az első 4–7 nap alatt árnyékolva. Gyakran segít, ha egy tiszta műanyag tetőt felfordítva az átültetett növények fölé helyezünk néhány napra.

Amikor a növények kellőképpen rögzültek, úgy kezeljük azokat, mint normális Zea mays növényeket, és

üvegházban növesztjük érésig, hogy megvizsgáljuk termőképességre és a bevezetett gének öröklődésére.

12b példa. A növények regenerálása

A 12a példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy 50 mg/liter higromicin B-t adunk a kallusz fenntartásához alkalmazott tápközegbe.

12c példa. A növények regenerálása

A 12a példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy 100 mg/liter higromicin B-t adunk a kallusz fenntartásához alkalmazott tápközegbe.

12d példa. A növények regenerálása

A 12a példát ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy 200 mg/liter higromicin B-t adunk a kallusz fenntartásához alkalmazott tápközegbe.

13. példa. Transzformálás és regenerálás

A 8., 9., 10. vagy 11. példák bármelyikét ismételjük meg, csak azzal a különbséggel, hogy a pCIB10/35SBt plazmidot alkalmazzuk plazmid DNS-ként, és a G418 antibiotikumot alkalmazzuk higromicin helyett a szelekciós lépésben.

14. példa. Mind a kiméra higromicin rezisztencia gént, mind a kiméra Bt gént tartalmazó pIRV megalkotása

pCIB 712 plazmidot emésztünk SmaI-gyel. pCIB10/35SBt-t emésztünk SphI-gyel, DNS-polimeráz nagy fragmentumával (Klenow-enzim) kezeljük, hogy egybevágó végeket alakítsunk ki, majd emésztjük SmaI-gyel. A kiméra Bt gént tartalmazó mintegy 4,8 kb-s fragmentumot agarózgél-elektroforézissel tisztítjuk, és az SmaI-gyel hasított pCIB 712 DNS-hez ligáljuk. Az így létrejövő plazmid, a pIRV tartalmazza mind a kiméra higromicin rezisztencia gént, mind a kiméra Bt gént. A pIRV-t a kiméra génektől disztális (távol eső) helyen az elektroporáció előtt linearizáljuk.

15. példa. Transzformálás és regenerálás

A 8., 9., 10. vagy 11. példákat ismételjük meg, azzal a módosítással, hogy a pIRV plazmidot alkalmazzuk plazmid DNS-ként, és higromicint alkalmazunk a szelekcióban.

16. példa. Kiméra kitináz gént és kiméra higromicin rezisztencia gént hordozó plazmidok megalkotása

Egy, a dohány kitináz gén kódolóterületét hordozó cDNS klónt, pCHN50-et azonosítunk pBR322 PstI helyébe klónozott dohány cDNS-ek könyvtárában. A hibrid-szelektált transzláció olyan fehérjeterméket ad, amely keresztreakcióba lép a bab kitináz ellen kialakított antitesttel [Shinshi és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *84*, 89–93 (1987)]. A dohány DNS lambda-könyvtárából a megfelelő genom klónt azonosítjuk – lambda-CHN17 – (Shinshi és munkatársai: PMB, *14*, p. 357–368, 1990), a cDNS klónt alkalmazva vizsgálómintaként (Maniatis és munkatársai, fentebb idézett munka). A hibridizációs és restrikciós térképezési tanulmányokat alkalmazzuk, hogy azonosítsunk egy PstI helyet, amely közös a cDNS klónban és a genom klónban.

A genom DNS-szekvencia elemzése ettől a közös PstI helytől felfelé feltárja a kitináz struktúrgénhez szolgáló nyitott leolvasó keret rajtját, valamint egy SphI felismerő helyet a rajthelytől számított –35. helyen. A következő lépéseket alkalmazzuk, hogy egyesítsük ezt a fölfelé lévő genom DNS-fragmentumot a lefelé lévő cDNS-fragmentummal, a kitináz teljes hosszúságú kódolóterületét alakítva ki:

a) A teljes hosszúságú gént a pGY1 plazmid vektorban alkotjuk meg, amely tartalmaz egy CaMV 35S promotor fragmentumot, egy CaMV-ből származó terminációs/poliadenilező szignált és egy, a között a kettő között lévő polilinkert. A polilinker polaritása biztosítja a felfelé lévő fragmentum megfelelő orientációját; a lefelé lévő fragmentum orientációját szekvenciaanalízissel határozzuk meg.

A genom klónból a fölfelé lévő SphI/PstI fragmentumot izoláljuk és tisztítjuk; ezt aztuán a pGY1 plazmidba ligáljuk, amelyet előzőleg SphI-gyel és PstI-gyel emésztettünk.

b) Az így létrejött intermedier plazmidot PstI-gyel emésztjük. A lefelé lévő PstI fragmentumot izoláljuk a pCHN50 klónból, és ligáljuk ebbe az emésztett intermedier termékbe.

c) A klónt, amely korrekt orientációval és a fölfelé lévő genom DNS-fragmentumba kereten belül fuzionált cDNS-fragmentummal rendelkezik, DNS-szekvencia-elemzéssel igazoljuk. Az így létrejött plazmidot pSCH1-nek nevezzük. A pSCH1 plazmidot (E. coli K12 törzsben) deponáltuk a Detusche Sammlung von Mikroorganismen törzsgyűjteményben (Göttingen, Nyugat-Németország), DSM 4129 deponálási számon. A deponálást a Budapesti Szerződés követelményei szerint végeztük (a deponálás időpontja: 1987. május 29.).

A CaMV 35S promotor és terminátor területekkel szegélyezett komplett kitináz gént kivágjuk a pSCH1-ből EcoRI emésztéssel. A fragmentumot tompa végűvé tesszük DNS-polimeráz nagy fragmentum alkalmazásával (Maniatis, korábban idézett munka). A pCIB 712 receptor plazmidot, amely olyan kiméra higromicin rezisztencia gént tartalmaz, amely növényi sejtekben kifejeződik, SmaI-gyel emésztjük. Az SmaI-gyel emésztett pCIB712-t és a kiméra kitináz gént tartalmazó tompa végű fragmentumot együtt ligáljuk, T4 ligázt alkalmazva (Maniatis, fentebb idézett munka). Az így létrejött plazmidot pCIBcht-nek nevezzük. A protoplaszt transzformálás előtt a pCIBcht-t linearizáljuk valamely, a kiméra génektől távol eső (disztális) helynél.

17. példa. Szulfonil-karbamid rezisztenciát átadó kiméra AHAS gént hordozó vektor megalkotása

a) *Szulfonil-karbamid-rezisztens (SU-R) Arabidopsis növények izolálása*

Etil-metánszulfonát (EMS)-mutagenizált M2 Arabidopsis thaliana (Kolumbia-fajta) magokat állítunk elő Haughn és Sommerville [Mol. Gen. Genet., *204*, 430–434 (1986)] és Sommerville és Ogren [Methods in Chloroplast Molecular Biology, szerkesztők: Edelman

és munkatársai, 129–138. oldal (1982)] szerint. Az EMS-t 0,3% koncentrációban alkalmazzuk 14–26 órán át, és az M1 magokat elültetjük, és növesztjük 2–3 növény/cm² sűrűséggel.

A szulfonil-karbamid (SU-R)-rezisztens Arabidopsis növényeket szelektáljuk, és növesztjük az M2 magkészletből Haughn és Sommerville szerint (fentebb idézett munka).

b) *SU-R Arabidopsis DNS rekombináns lambda-fág könyvtárának megalkotása*

DNS-t izolálunk SU-R Arabidopsis növényekből Jen és Chilton szerint [J. Bacteriol., *166*, 491–499 (1986)]. Az Arabidopsis DNS-t teljességig emésztjük XbaI-gyel (New England Biolabs). 4–8 kbp hosszméretű DNS-fragmentumokat izolálunk agarózgélről, NA45 DEAE membránt alkalmazva (Schleicher és Schüell, Keene, N. H. 03431 katalógusszám), és lambda-ongC-X vektorba klónozzuk (Stratagene, 3770 Tansy St., San Diego, CA 92121), a gyártó által ajánlott eljárást alkalmazva. A rekombináns fág DNS-t kapszidba zárjuk, a Stratagene cég Gigapack-plus készletét alkalmazva.

c) *SU-R acetohidroxi-sav szintáz (AHAS) gén klónozása SU-R Arabidopsis növényekből*

pE16/8-c4 plazmidot, amely a Saccharomyces cerevisiae ILV2 lókuszát [Polaina J.: Carlsberg Res. Comm., *49*, 577–584 (1984)] tartalmazza, E. coli HB101-be transzformáljuk, és nagy léptékben plazmidkészítményt állítunk elő. A pE16/8-c4 plazmid deponálva van az American Type Culture Collectionnál, ATCC 67420 deponálási számon. Ez a deponálás a Budapesti Szerződés követelményei szerint történt (a deponálás dátuma: 1987. május 29.). A pE16/8-c4 plazmid DNS-t emésztjük EcoRI-gyel, és az AHAS kódolószekvenciát [Falco és munkatársai: Nucl. Acid. Res., *13*, 4011–4027 (1985)] tartalmazó 2,1 kbp-s (Eco 2.1) fragmentumot agarózgélről izoláljuk. Az Eco 2.1 fragmentumot radioaktívan jelezzük 32-foszforral $5–8 \cdot 10^8$ cpm/μg fajlagos aktivitásra PRIME TIME készlettel (International Biotechnologies, Inc.).

Arabidopsis XbaI fragmentumokat tartalmazó rekombináns fágokat E. coli VCS 257 lemezekre visszük Maniatis és munkatársai [Cold Spring Harbor, N.Y. (1982)] és a Stratagene munkamenete szerint.

A lambda-tarfoltokat tartalmazó lemezekről duplikátumokat szedünk fel az egyes fáglemezekről Colony/PlaqueScreen^R membránnal (New England Research Products) a gyártó munkamenete szerint. A tarfoltokat tartalmazó lemezeket a következőképpen kezeljük:

i) 5xSSC-t és 2% SDS-t tartalmazó oldattal mossuk 65 °C hőmérsékleten 6 órán át (minden recept Maniatis és munkatársai fentebb idézett munkájából származik);

ii) prehibridizáljuk hibridizálókeverékben (5xSSC, 1% SDS, 5xDenhardt-oldat, 200 μg/ml denaturált és felaprított lazac DNS, 25% formamid, 10% dextránszulfát, 10 ml keverék 150 mm membránra) 42 °C hőmérsékleten 16–20 órán át;

iii) hibridizáljuk 2 ng/ml denaturált, radioaktívan jelzett Eco 2.1 fragmentumot tartalmazó hibridizálókeverékben (10 ml 150 mm membránra) 42 °C hőmérsékleten 20 órán át;

iv) mossuk 2xSSC-t és 1% SDS-t tartalmazó oldatban szobahőmérsékleten 30 percen át;

v) mossuk 5xSSC-t, 1% SDS-t és 25% formamidot tartalmazó oldatban 42 °C hőmérsékleten 6–8 órán át, a mosóoldatot négyszer cserélve. A membránokat röntgensugárfilmen (Kodak X–Omat AR) előhívjuk. A membránduplikátumokon egybevágó hibridizálást mutató fág tarfoltokat egy második lépésben tisztítjuk, lambda-tarfoltoknak a lemezekről való kivételével és Eco 2.1 vizsgálómintával végzett hibridizálással.

Az élesztő AHAS-szekvenciákkal homológ beiktatást tartalmazó rekombináns fágplakkok lizátumait elkészítjük Maniatis és munkatársai szerint (fentebb idézett munka). A fág DNS-t a lizátumokból LambdaSorbbal állítjuk elő (Promega, 2800 S. Fish Hatchery Road, Madison, WI 53711), a gyártó ajánlott munkamenete szerint.

d) *SU-R Arabisopsis AHAS gént tartalmazó pCIB803 transzformációs vektor megalkotása és vizsgálata*

A rekombináns fág DNS-t XbaI-gyel emésztjük, és az 5,8 kbp-s beiktatási fragmentumot XbaI-gyel emésztett pCIB10 transzformációs vektorba klónozzuk, hogy megkapjuk a pCIB803-at. A pCIB803 plazmidot átvisszük az E. coli HB101 gazdaszervezetből Agrobacterium tumefaciens CIB542-be, háromszülős párosítással [Ditta és munkatársai: Proc. Acad. Sci. USA, *77*, 262–269 (1980)]. Az A. tumefaciens CIB542-t a következők szerint állítottuk elő:

– A Ti plazmid (pTIBo542) T-DNS delécios származéka előállítására vonatkozóan a következő irodalmi helyekre hivatkozunk:
D. Sciaky et al., Plasmid 1, p. 238–253, 1978,
E. E. Hood et al., J. Bact. 168, p. 1291–1301, 1988.
A pEHA101-nek nevezett utóbbi konstrukcióban a T-DNS-t egy kanamicin rezisztencia gén helyettesíti.

– Azt a pEHA101-származékot, amely a kanamicin rezisztencia gén helyett spektinomicin rezisztencia gént tartalmaz, a következők szerint állítjuk elő:

– A ppidelta307 plazmid (E. E. Hood et al., 1986) egy 1,7 kb nagyságú homológiatartománnyal rendelkezik a pTiBo542 BamHI–5-jének bal oldalán (E. E. Hood et al., Biotechnology 2, p. 702–708, 1984) és egy 8 kb méretű homológiatartománnyal a pTiBo542 jobb oldalán; ezeket az egyetlen EcoRI hely választja el.

– A pMON30 plazmid, amelyet a Monsanto Corp.-tól (St. Louis, Mo.) szereztünk be, a Tn7 (S. Hollingshead et al., Plasmid 13, p. 17–30, 1985) spektinomicin/streptomicin rezisztencia génjét hordozza. A pMON30-at EcoRI-vel elbontjuk, az 5,5 kb méretű fragmentumot – amely a spc/str gént hordozza – elkülönítjük az agarózgélből, és az EcoRI-gyel kezelt (restrikciós) ppidelta307-hez ligáljuk. A keresett rekombinánst az E. coli HB101 transzformánsként izoláljuk, amely spektinomicin- (50 μg/ml) és tetraciklin- (10 μg/ml) rezisztens.

– A plazmid-DNS-t transzformációval juttatjuk be az A136/pEHA101 A. tumefaciensbe (Hood et al., 1986). A keresett transzformánst azon az alapon szelektáljuk, hogy a fenotípus: streptomicinrezisztens, tetraciklin-rezisztens, kanamicinsrezisztens.

A pEHA101 homogenótáit (A. J. M. Matzke et al., J. Mol. Appl. Genet., *1*, p. 39–49, 1981) és a spektinomicin plazmidot az R751–pMG2 evikciós plazmid (G. A. Jacoby et al., J. Bact., *127*, p. 1278–1285, 1976) párosító bevitele, majd gentamicinnel (50 μg/ml) és spektinomicinnel végzett szelekció után különítjük el. A keresett homogenóta „gentamicinrezisztens spektinomicinrezisztens tetraciklinérzékeny kanamicinérzékeny" fenotípusú. A kapott plazmid szerkezetét Southern-analízissel igazoltuk.

Az evikciós plazmidtól mentesített plazmidot ezután gyógyszerrezisztens fenotípusa (gentamicinérzékeny) alapján szelektáljuk. Ezt a szelekciót Southern-analízissel igazoljuk. Az A. tumefaciens pCIB803/CIB542-t alkalmazzuk Arabidopsis thaliana levél explantátumok transzformálására Lloyd és munkatársai [Science, *234*, 464–466 (1980)] vagy Shikholeslam és Wecks [Plant Molec. Biol., *8*, 291–298 (1987)] szerint.

A transzformált szöveteket növényekké regeneráljuk Lloyd és munkatársai (fentebb idézett munka) és Feldman és Marks [Plant Sci., *47*, 63–69 (1986)] szerint. A transzformált szövetek tápközegben növekedésénél kimutatjuk, hogy a szövet tűrőképes 3–10 ng/ml klór-szulfonra. A transzgén Arabidopsis növények csírázásáról és növekedéséről kimutatjuk, hogy tűrőképes 10–30 ng/ml klór-szulfonra.

e) *Kiméra SU-R AHAS gént tartalmazó pCIB804 transzformációs vektor megalkotása*

Az AHAS kódolószekvencia elhelyezkedését az Xba 5.8 fragmentumon belül S1-nukleáz térképezéssel (Maniatis és munkatársai, fentebb idézett munka), primer kiterjesztéssel [McKnight és munkatársai: Cell, *25*, 385–398 (1981)] határozzuk meg, és DNS-szekvenciaelemzéssel [Sanger és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *74*, 5463–5467 (1977)] és a bakteriális és élesztő AHAS-szekvenciák fehérjeszekvencia összehasonlításával [Falco és munkatársai: Nucl. Acid. Res., *13*, 4011–4027 (1985)] igazoljuk. Az 5,8 kb-s XbaI fragmentumot a Bluescript vektorba (Stratagene a forgalmazó) klónozzuk, és az AHAS kódolószekvenciától fölfelé lévő szekvenciákat kiiktatjuk 10–20 bp-n belül az AHAS iniciációs kodontól fölfelé, Exo/Mung Deletion készletet (Stratagene) alkalmazva. Megfelelő kapcsolót rögzítünk a kiiktatási (deléciós) végponthoz. A linker szerkezete a következő:

TATGTGACGAGAGATCTGATGC
ACACTGCTCTCTAGACTACG

A megcsonkított AGAS gént a megfelelő restrikciós helynél elhasítjuk, legalább 10 bp-vel az AGAS terminációs kodon előtt, és ugyanazt a kapcsolót, amelyet a gén 5'-végénél alkalmazunk, rögzítjük a gén 3'-végénél is. Az AHAS kódolószekvenciát tartalmazó fragmentumot kimetsszük a vektorból, a kapcsoló- (linker) helyeknél hasítva, és a pCIB710 BamHI helyébe klónozzuk.

A pCIB710 BamHI helye alkalmas arra, hogy befogadja a kapcsolóval ellátott SU-R AHAS gént. Az AHAS gén pCIB710-be való beiktatása orientációját EcoRI és ApaI restrikciós enzimekkel határozzuk meg.

A CaMV 35S promotor átírási iránya tekintetében korrekt módon orientált AHAS kódolószekvenciát tartalmazó klónt pCIB 804-nek nevezzük.

18. példa. Kallusz képzésének elősegítése Zea mays protoplasztokból 2,4-D-vel és acetil-szalicilsavval

A 3. példa utolsó lépése szerinti protoplasztokat újra szuszpendáljuk 6/7 erősségű (6 rész KMC-törzsoldat+ 1 rész víz) KMC-oldatban 7,5 millió/ml-re. Az O-acetilszalicilsavat feloldjuk 2,5 mg/ml KM végkoncentrációjú tápközegben. Az oldatot szűréssel sterilizáljuk. Az acetil-szalicilsavat azután hozzáadjuk a tenyésztő tápközeghez, közvetlenül felhasználás előtt. A protoplasztszuszpenzió alikvotjait 6 cm átmérőjű Petri-csészékre helyezzük szobahőmérsékleten. 3 ml, 1,2% (tömeg/térfogat) SeaPlaque^R agarózt, 2,4-D-t és O-acetilszalicilsavat tartalmazó KM-tápközeget adunk hozzá úgy, hogy a megfelelő 2,4-D és acetil-szalicilsav-koncentráció alakuljon ki, és 0,5 millió/ml protoplasztsűrűség. Az agarózt és a protoplasztokat alaposan összekeverjük, és a tápközeget hagyjuk megdermedni.

A lemezeket olyan módon tenyésztjük, ahogyan a 8. példában leírtuk. 3 hetes időtartama után a lemezeken felbukkanó makroszkópos telepeket megszámoljuk. Az eredményeket a 2. és 3. táblázatban adjuk meg két különböző, függetlenül kapott embriogén szuszpenziós tenyészetből.

2. táblázat

Zea mays protoplasztok telepképzése acetil-szalicilsav és 2,4-D jelenlétében (a számok a képződött telepek számai)

		O-acetil-szalicilsav (mg/l)					
		0	1	3	10	30	100
2,4-D (mg/liter)	0	0	0	0	4	13	1
	0,3	63	2	6	15	83	146
	1,0	9	7	NT	20	64	215
	3,0	3	1	0	6	45	111

NT: nem vizsgáltuk

3. táblázat

Zea mays protoplasztok telepképzése acetil-szalicilsav és 2,4-D jelenlétében (a számok a képződött telepek számai)

		0	1	3	10	30	100
2,4-D (mg/liter)	0	0	1	0	0	0	0
	0,3	0	0	0	0	0	2
	1,0	1	1	2	21	31	38
	3,0	0	3	1	9	41	34

7. ábra. 2,4-D-t és acetil-szalicilsavat tartalmazó vagy nem tartalmazó KM tápközegre helyezett Zea mays protoplasztokból kiemelkedő telepek.
Balra fent: 2,4-D vagy acetil-szalicilsav nincsen.
Jobbra fent: 1 mg/liter 2,4-D és acetil-szalicilsav nincs.
Balra lent: 100 mg/liter acetil-szalicilsav és 2,4-D nincs.
Jobbra lent: 100 mg/liter acetil-szalicilsav és 1 mg/liter 2,4-D.

19. példa. *Zea mays protoplasztjaiból megnövekedett telepképzés acetil-szalicilsav és 2,4-D hozzáadásával*

A protoplasztokat előállítjuk, és tenyésztéshez lemezre helyezzük, amint ezt a 18. példában leírtuk, 2 ml tápközegben 6 cm átmérőjű Petri-csészében.

A csészéket úgy tenyésztjük, ahogyan ezt a 10. példában leírtuk. 3 hetes időtartam elteltével a csészében felbukkanó makroszkópos telepeket megszámoljuk. Az eredményeket a 4. táblázat mutatja be. Az acetil-szalicilsavról ismét azt találjuk, hogy stimulálja a telepképződést. 300 mg/liternél azonban és ennél nagyobb koncentrációnál toxikus hatást találtunk. Arra a megfontolásra jutottunk, hogy ez pH-probléma következménye lehet, és lehet, hogy ezt ki lehet küszöbölni a közeg megfelelő pufferolásával.

4. táblázat

Zea mays protoplasztok telepképzése (csészénként) acetil-szalicilsav és 2,4-D jelenlétében (a számok a képződött telepek számai)

		Acetil-szalicilsav				
		0	30	100	300	1000
2,4-D (mg/liter)	0	0	0	0	0	0
	0,3	32	212	438	0	0
	1,0	72	405	327	0	0
	3,0	18	25	69	0	0

20. példa. *Zea mays protoplasztokból történő telepképzés elősegítése DMSO-val és acetil-szalicilsavval 2,4-D jelenlétében*

A protoplasztokat olyan módon készítjük el és visszük lemezre 0,75 millió/ml-rel, amint ezt a 18. példában leírtuk, 1 ml tápközeget alkalmazva 3,5 cm átmérőjű Petri-csészénként. Az O-acetil-szalicilsav benne van a tápközegben. Az acetil-szalicilsavat DMSO-ban oldjuk, majd hozzáadjuk a tápközeghez a protoplasztok lemezre helyezése előtt. Ennek érdekében 1 g acetil-szalicilsavat feloldunk 10 ml DMSO-ban, és hozzáadjuk 90 ml desztillált vízhez. Az oldatot azután szűréssel sterilezzük használat előtt.

A csészéket úgy tenyésztjük, amint ezt a 10. példában leírjuk. 3 hetes időtartam után a csészékben felbukkanó markoszkópos telepeket megszámoljuk. Az eredményeket az 5. táblázatban mutatjuk be. A DMSO egymagában (1%, térfogat/térfogat) nem ad szignifikáns növekedést vagy csökkenést a Zea mays protoplasztok telepképző hatékonyságában, és nyilvánvalóan potencírozza az O-acetil-szalicilsav stimulátoraktivitását.

5. táblázat

Az acetil-szalicilsav hatása a Zea mays protoplasztok által végzett telepképzésre, bemutatva a DMSO-ban feloldott acetil-szalicilsav stimulátorhatását

2,4-D, mg/liter	Adalék nélkül	100 mg acetil-szalicilsav/liter
0	0	0
0,1	1	28
0,3	2	235
1,0	45	>300

21. példa. *Zea mays protoplaszt telepképzésének növelése 2,4-D és rokon növényi-növekedés-szabályozók (auxinok) hozzáadásával*

A 3. példa utolsó lépése szerinti protoplasztokat újra szuszpendáljuk 6/7 (6 rész KMC törzsoldat + 1 rész víz) erősségű KMC-oldatban, 5 millió/ml koncentrációban.

A protoplaszt szuszpenzió alikvotját 6 cm átmérőjű Petri-csészére visszük fel, szobahőmérsékleten. 2 ml KM tápközeget adunk hozzá, amely 1,2% (tömeg/térfogat) SeaPlaque^R agarózt tartalmaz, és 2,4-D-ből, Picloramból, Dicambából vagy paraklór-fenoxi-ecetsavból (pCPA) annyit, hogy a növény növekedését szabályozó koncentrációk kialakuljanak. Az alkalmazott végső protoplasztsűrűség 0,54 millió/ml. Az agarózt és a protoplasztokat alaposan összekeverjük, és a tápközeget hagyjuk megdermedni.

A csészéket úgy tenyésztjük, amint ezt a 10. példában leírtuk. 3 hetes periódus után a csészékben felbukkanó makroszkópos telepeket megszámláljuk. Az eredményeket a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat

Telepképzés Zea mays tenyésztett protoplasztjaiból különböző növénynövekedés-szabályozók (auxinok) jelenlétében (a képződött telepek száma)

	Növénynövekedés-szabályozó (mg/liter)			
Auxin	0	0,1	1	10
2,4-D	0	140	0	0
Picloram	0	6	101	7
Dicamba	0	62	288	0
pCPA	0	52	0	0

22. példa. Mintegy 725 aminosavat tartalmazó, deléciós Bt protoxin gén megalkotása, és ezt a deléciós gént tartalmazó kiméra gén megalkotása CaMV 35S promotorral

Mintegy 725 aminosavat tartalmazó, deléciós protoxin gént állítunk elő olyan módon, hogy a gén COOH-terminális részét eltávolítjuk a KnpI restrikciós endonukleáz helynél végzett hasítással, vagyis a 13. ábrában lévő I. képletben bemutatott szekvenciában a 2325. helynél. pCIB10/35SB-t (12. ábra) emésztünk BamHI-gyel és KnpI-gyel, és a deléciós protoxin gént tartalmazó mintegy 2,2 kbp-s BamHI/KnpI fragmentumot izoláljuk preparatív agaróz gélelektroforézissel. Abból a célból, hogy a 3'-végnél a KnpI helyet BamHI hellyé alakítsuk, a fragmentumot összekeverjük egy KnpI/BamHI adapter oligonukleotiddal – amelynek DNS-szekvenciája az (1) és (2) oligonukleotid komponensnek

(1) GATCCCGTAG CTAGGTAC

(2) CTAGCTACGG

megfelelően, amelyek összeillesztésével a linkert előállítjuk:

GATCCCGTAG CTAGGTAC

GGCATC GATC – és ligáljuk. Ezt a fragmentumot azután összekeverjük BamHI-gyel hasított pCIB10/710-zel (11. ábra). Az így létrejött transzformáns, amelyet pCIB10/35SBt (KnapI)-nek nevezünk, és a 15. ábrában mutatunk be, tartalmazza a mintegy 725 aminosavat tartalmazó kiiktatott (deléciós) protoxin gént. Ezeket a transzformánsokat kanamicinen szelektáljuk.

23. példa. Mintegy 645 aminosavat tartalmazó, deléciós Bt protoxin gén megalkotása, és ezt a deléciós gént tartalmazó kiméra gén megalkotása CaMV 35S promotorral

Mintegy 645 aminosavat tartalmazó deléciós protoxin gént állítunk elő olyan módon, hogy a gén COOH-terminális részét eltávolítjuk a BclI restrikciós helynél végzett hasítással, vagyis a 13. ábrában lévő I. képletben bemutatott szekvenciában a 2090. helynél. pCIB10/35SBt plazmidot (12. ábra) emésztünk BamHI-gyel és BclI-gyel, és a deléciós protoxin gént tartalmazó mintegy 1,9 kbp-s BamHI/BclI fragmentumot izoláljuk preparatív agaróz gélelektroforézissel. Mivel a BclI BamHI-gyel összeférhető kohezív véget képez, további manipuláció nem szükséges ennek a fragmentumnak a ligálása előtt BamHI-gyel hasított pCIB10/710-be (11. ábra). Az így létrejövő plazmidot, amely a pCIB10/35SBt (BclI) szerkezettel rendelkezik, és amelyet a 16. ábrán mutatunk be, kanamicinen szelektáljuk.

24. példa. Mintegy 607 aminosavat tartalmazó deléciós Bt protoxin gén megalkotása, és ezt a deléciós gént tartalmazó kiméra gén megalkotása CaMV35S promotorral

Deléciós protoxin gént állítunk elő egy BamHI hasítási hely (GGATCC) bevezetésével az I. képletben (13. ábra) bemutatott szekvenciában az 1976. nukleotidot követően. A Bt gén ezen mutageneziséhez a következő primert használjuk fel:

GTTGAGTGTTTATCTGGATCCATGAATTTTGTCTG.

Ezt úgy végezzük el, hogy a pCIB10/35SBt-ből származó protoxin szekvenciát tartalmazó BamHI fragmentumot mp18-ba klónozzuk, és az előbbiekben leírt standard oligonukleotid mutagenezises eljárást alkalmazzuk. Mutagenezis után kettős szálú, replikatív DBS-t állítunk elő M13 klónból, amelyet azután BamHI-gyel emésztünk. A deléciós protoxin gént tartalmazó, mintegy 1,9 kbp-s fragmentumot beiktatjuk a BamHI-gyel hasított pCIB10/710-be. Az így létrejött plazmidot, amely a pCIB10/35SBt (607) szerkezettel rendelkezik, és amelyet a 17. ábrában mutatunk be, kanamicinen szelektáljuk. Az előbbiekben leírt oligonukleotidos mutagenezis a szakember által ismert standard eljárások közé tartozik, amelyek például Norrander et al. (Gene, *26*, p. 101–16, 1983) és Zoller et al. (DNA, *3*, 6, p. 479–488, 1984) ír le.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás Zea mays kallusztenyészetének előállítására, amelyből protoplasztokat lehet izolálni, amely protoplasztok képesek termőképes növényekké regenerálódni, *azzal jellemezve,* hogy

(a) Zea mays növényekből származó szövetet tenyésztünk alkalmas kalluszkialakító és/vagy kalluszproliferációt fenntartó tápközegen, amíg egy speciális típusú kalluszt kapunk, amely viszonylag nem nyálkás, szemcsés és morzsalékony;

(b) szelektáljuk az említett speciális típusú kalluszt; és

(c) növesztjük az említett speciális típusú kalluszt egy megfelelő kalluszt fenntartó tápközegen.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az (a) lépés szöveteként kallusz képzésére képes, fejletlen Zea mays szövetet, mely előnyösen éretlen kukoricahajból, kifejletlen embriókból, fiatal levelek bazális részéből vagy fejletlen embriók pajzslemezeiből származik, alkalmazunk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az (a) lépés éretlen szöveteként 1–4 mm hosszúságú kifejletlen embriókat alkalmazunk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az (a) lépésben a szövettenyésztést és a (c) lépésben a viszonylag nem nyálkás, szemcsés és morzsalékony kallusz növesztését megfelelő koncentrációjú cukrok és növényi növekedést szabályozók jelenlétében végezzük.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

5. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az (a) lépésből származó kalluszkezdeményt altenyésztésnek vetjük alá friss fenntartó tápközegben 1–120 nap időközönként, 0 °C és 50 °C közötti hőmérsékleten, amíg a viszonylag nem nyálkás, szemcsés és morzsalékony, (a) lépés szerinti speciális kallusz azonosítható.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az (a) lépésből származó viszonylag nem nyálkás, szemcsés és morzsalékony speciális kalluszt altenyésztésnek vetjük alá friss fenntartó tápközegben 1–120 naponként.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

7. Eljárás Zea mays sejtek és sejtaggregátumok sejtszuszpenziós tenyészeteinek előállítására, amelyekből protoplasztokat lehet izolálni, amely protoplasztok képesek termőképes növényekké regenerálódni, *azzal jellemezve,* hogy

(a) Zea mays növényekből származó szövetet tenyésztünk egy alkalmas kalluszkialakító és/vagy kalluszproliferációt fenntartó tápközegen, amíg egy speciális, viszonylag nem nyálkás, szemcsés és morzsalékony kallusz azonosítható;

(b) szelektáljuk az említett speciális típusú kalluszt;

(c) adott esetben altenyésztésnek vetjük alá az említett speciális típusú kalluszt egy megfelelő kalluszt fenntartó tápközegen;

(d) átvisszük az említett speciális típusú kalluszt folyékony tápközegre sejtek vagy sejtaggregátumok szuszpenzióinak előállítására;

(e) a szuszpenziót altenyésztésnek vetjük alá olyan gyakorisággal, mely elegendő a sejtek és sejtaggregátumok élő állapotban való fenntartásához, amíg sűrűn citoplazmás osztódó sejteket nem kapunk; és

(f) kiválasztjuk és megőrizzük az (e) lépés termékéből azokat a tenyészeteket, amelyek a sűrűn citoplazmás, osztódó sejtek aggregátumait tartalmazzák.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az (e) lépés szerinti szuszpenziót körülbelül 7 napon keresztül vetjük alá altenyésztésnek, és olyan gyakorisággal, mely elegendő a sejtek és sejtaggregátumok élő állapotban való fenntartásához.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

9. A 7. vagy 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az (e) lépés szerinti altenyésztést addig végezzük, míg a szuszpenziós tenyészet a sűrűn citoplazmás, osztódó sejteket és sejtaggregátumokat legalább 50%-ban tartalmazza.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

10. Eljárás Zea mays protoplasztok, melyek képesek termőképes növényekké regenerálódni, előállítására, *azzal jellemezve,* hogy

(i) veszünk egy, az 1. igénypont szerint előállított kalluszt; vagy

(ii) veszünk egy, a 7–9. igénypontok bármelyike szerint kapott sejttenyészetet, amely sejttenyészet sűrűn citoplazmás, osztódó sejtek aggregátumaiból áll;

és egy alkalmas enzimkészítménnyel eltávolítjuk a sejtfalakat, majd összegyűjtjük, és tisztítjuk a kapott protoplasztokat.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

11. Eljárás Zea mays növények regenerálására protoplasztokból, *azzal jellemezve,* hogy

(i) termőképes növényekké regenerálódni képes protoplasztokat állítunk elő a 10. igénypont szerinti eljárással,

(ii) az említett protoplasztokat egy megfelelő tápközegre szélesztjük, amelyben a protoplasztok osztódnak, és sejteket képeznek,

(iii) a kapott sejteket altenyésztésnek vetjük alá, és

(iv) a csíranövényeket növesztő tápközegen regeneráljuk termőképes transzgén növények előállítására.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy stabilan beépített exogén DNS-t tartalmazó Zea mays protoplasztokat alkalmazunk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy Zea maysban kifejezhető DNS-t alkalmazunk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

14. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a Zea mays protoplasztokat a növekedésszabályozáshoz hatékony, nem toxikus mennyiségű növényi növekedést szabályozó jelenlétében, és a sejtosztódás vagy telepképzés elősegítéséhez elegendő mennyiségű O-(rövid szénláncú)-alkanoil-szalicilsav jelenlétében tenyésztjük.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a növényi növekedést szabályozó anyagot körülbelül 0,01–100 mg/liter koncentrációban alkalmazzuk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy O-(rövid szénláncú)-alkanoil-szalicilsavként O-acetil-szalicilsavat vagy O-propionil-szalicilsavat alkalmazunk.
(Elsőbbsége: 1988. 05. 20.)

17. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a Zea mays protoplasztokat az alábbi növénynövekedés-szabályozók valamelyikének jelenlétében: dicamba, picloram, pCPA vagy 2,4-D és a sejtosztódás vagy telepképzés elősegítéséhez elegendő mennyiségű O-(rövid szénláncú)-alkanoil-szalicilsav, ezen belül O-acetil-szalicilsav vagy O-propionil-szalicilsav jelenlétében tenyésztjük.
(Elsőbbsége: 1988. 05. 20.)

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy növényi növekedést szabályozó anyagként 2,4-D-t a 0,1–100 mg/liter tartományban és O-(rövid szénláncú)-alkanoil-szalicilsavként O-acetil-szalicilsavat alkalmazunk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

19. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a közeg alkotórészeként a sejtosztódás vagy telepképzés elősegítéséhez elegendő mennyiségű DMSO-t is alkalmazunk.
(Elsőbbsége: 1988. 05. 20.)

20. Eljárás termőképes növényekké regenerálódni képes transzgén Zea mays protoplasztok előállítására, *azzal jellemezve,* hogy a 10. igénypont szerinti eljárással kapott protoplasztokat exogén DNS-sel kezeljük, és olyan Zea mays sejteket állítunk elő, amelyek a teljes exogén DNS-t vagy annak egy részét genetikai anyagukba beépítve tartalmazzák.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

21. Eljárás egy transzgén és termőképes Zea mays növény előállítására, amely a kukoricagenomba beépített exogén DNS-t tartalmaz, *azzal jellemezve,* hogy

(a) Zea mays növényekből származó szövetet tenyésztünk egy alkalmas kalluszt kialakító és/vagy kalluszproliferációt fenntartó tápközegben, amíg egy speciális típusú kallusz, mely viszonylag nem nyálkás, szemcsés és morzsalékony, azonosítható;

(b) szelektáljuk az említett speciális típusú kalluszt;

(c) az említett speciális típusú kalluszt egy megfelelő kalluszfenntartó tápközegen növesztjük;

(d) adott esetben az említett speciális típusú kalluszt folyékony táptalajra visszük át sejtek vagy sejtaggregátumok szuszpenziójának előállítására;

(e) a szuszpenziót altenyésztésnek vetjük alá olyan gyakorisággal, mely elegendő ahhoz, hogy a sejteket és sejtaggregátumokat életképes állapotban tartsuk, sűrűn citoplazmás, osztódó sejtek képződéséig;

(f) szelektáljuk és megőrizzük az (e) lépésből azokat a tenyészeteket, amelyek a sűrűn citoplazmás, osztódó sejtek aggregátumait tartalmazzák;

(g) vesszük az (a)–(c) lépésekben kapott kalluszt vagy a (d)–(f) lépésekben kapott tenyészeteket, eltávolítjuk a sejtfalakat alkalmas enzimkészítményekkel, majd összegyűjtjük és tisztítjuk a kapott protoplasztokat;

(h) az így kapott protoplasztokat exogén DNS-sel kezeljük olyan sejtek előállítására, amelyek a teljes exogén DNS-t vagy annak egy részét tartalmazzák genetikai anyagukba beépítve;

(i) a protoplasztokat szélesztjük egy megfelelő tápközegre, amelyben a protoplasztok osztódnak és sejteket képeznek;

(j) a kapott sejteket altenyésztésnek vetjük alá; és

(k) csíranövényeket regenerálunk növesztő tápközegen, transzgén termőképes növények előállítására.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy egy további lépésként tartalmazza a teljes növény szexuális vagy vegetatív reprodukálását az exogén DNS legalább egy kópiájának az így kapott utódsejtekben való jelenléte mellett.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

23. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a protoplasztokat exogén DNS-sel kezeljük PEG jelenlétében.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

24. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a protoplasztokat exogén DNS-sel kezeljük elektroporáció alkalmazásával.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

25. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a protoplasztok exogén DNS-sel való kezelését az alábbi lépések kombinációjával végezzük: PEG-es, kezelés és/vagy hősokk-kezelés, és/vagy a protoplasztok elektroporációja.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

26. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a kukoricanövényekben kifejezhető exogén DNS-t alkalmazunk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

27. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy olyan exogén DNS-t alkalmazunk, amely tartalmaz legalább egy kiméra gént vagy kiméra génrészt, és ez egy vagy több olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely átírható és/vagy kifejezhető kukoricanövényekben egy Zea maysban aktív promoter kontrollja alatt.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

28. A 27. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy olyan kiméra gént alkalmazunk, amely hordoz egy további 5'– és/vagy 3'–nem transzlatált régiót.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

29. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy olyan exogén DNS-t alkalmazunk, amely egy új fenotípusos jellemzővel rendelkező transzgén növényt eredményez, és ez az új jellemző az alábbiak egyike: megnövekedett rezisztencia kártevőkre, megnövekedett rezisztencia patogénekre, megnövekedett rezisztencia vegyi anyagokra, megnövekedett rezisztencia káros környezeti befolyásokra és a kívánatos anyagok fokozott képződése.
(Elsőbbsége: 1988. 05. 20.)

30. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a vegyi anyag egy citotoxin.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

31. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a vegyi anyag egy herbicid.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

32. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a kártevők Arthropodok, beleértve a rovarokat, atkákat és férgeket.
(Elsőbbsége: 1988. 05. 20.)

33. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a patogének fitopatogén gombák, baktériumok és vírusok.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

34. A 30. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a citotoxinnal szembeni rezisztenciát egy gén által biztosítjuk, amely a növényi sejtekben a citotoxint detoxikáló enzimet fejez ki.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

35. A 30. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a citotoxinnal szembeni rezisztenciát egy gén által biztosítjuk, amely a növényben a célenzim citotoxinra rezisztens formáját fejezi ki.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

36. A 35. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy célenzimként az aceto-hidroxisav szintáz egy megváltozott formáját fejezzük ki, amely rezisztens a szulfonil-karbamid és/vagy imidazolinon vagy egyéb, ebben a metabolikus lépésben ható herbicidek általi gátlásra.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

37. A 35. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy célenzimként az 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát (EPSP) szintáz egy megváltozott formáját fejezzük ki, amely nem érzékeny a glifozát általi gátlásra.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

38. A 32. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a kártevőkkel szembeni rezisztenciát egy gén által biztosítjuk, amely a növényi sejtekben egy inszekticid hatású polipeptidet fejez ki a növénynek inszekticid tulajdonságokat biztosító koncentrációkban.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

39. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a rezisztenciát egy proteáz inhibitort kódoló gén által biztosítjuk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

40. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a rezisztenciát egy szintetikus DNS által biztosítjuk, amely egy Bacillus thüringiensis delta-endotoxin kristályos fehérjét vagy egy olyan fehérjét kódol, amely még rendelkezik a kristályos fehéjre rovartoxikus tulajdonságaival.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

41. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a transzformált növényi sejt és a regenerált teljes növény, beleértve ezek utódait, a kódolt polipeptidet elegendő mennyiségben fejezi ki ahhoz, hogy az a növényt nemkívánatossá tegye a rovarlárvák számára.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

42. A 21. vagy 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az (a) lépésben olyan növényi szövetet alkalmazunk, amely egy Zea mays beltenyésztett vonal genotípusával rendelkező kukoricanövényből származik.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 20.)

43. Eljárás rovarlárvák gátlására, *azzal jellemezve,* hogy a lárvákat a 21. igénypont szerint előállítható transzgén Zea mays növénysejtek inszekticid hatású mennyiségével etetjük, amelyek a növényi sejtekben egy inszekticid hatású polipeptidet olyan szinten kifejező gént tartalmaznak, amely elegendő ahhoz, hogy a növényi sejtnek inszekticid tulajdonságokat kölcsönözzön.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

44. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a nevezett gén egy proteáz inhibitort kódol.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

45. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett gén egy szintetikus DNS-t tartalmaz, amely egy Bacillus thüringiensis delta-endotoxin kristályos fehérjét vagy egy olyan fehérjét kódol, amely még rendelkezik az említett kristályos fehérje rovartoxikus tulajdonságaival.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

46. A 43. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a növényi sejtek az élő Zea mays növény egy részét tartalmazzák.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

47. Eljárás Zea mays növények megvédésére egy patogén, egy kártevő vagy egy vegyszer által okozott károsodás ellen, *azzal jellemezve,* hogy a megvédendő Zea mays növényekbe a kukoricagenomba a 21. igénypont szerinti eljárással stabilan beépíthető exogén DNS-t viszünk be, és ez az exogén DNS kifejeződésekor a növény sejtjeiben a megfelelő rezisztenciát biztosító koncentrációkban növényvédő fehérjét fejez ki.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

48. A 47. igénypont szerinti eljárás Zea mays növények megvédésére patogének által okozott károsodás ellen, *azzal jellemezve,* hogy a megvédendő Zea mays növényekbe a kukoricagenomba stabilan beépített exogén DNS-t viszünk be, és ez az exogén DNS kifejeződésekor a növényi sejtben patogénellenes szempontból hatásos mennyiségű vagy a patogén megfékezésére elegendő mennyiségű fehérjét termel, amely patogénellenes vagy patogénmegfékező aktivitással rendelkezik.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

49. A 47. igénypont szerinti eljárás Zea mays növények megvédésére kártevők okozta kár ellen, *azzal jellemezve,* hogy a megvédendő Zea mays növényekbe a kukoricagenomba stabilan beépített exogén DNS-t viszünk be, és ez az exogén DNS kifejeződésekor a növényi sejtben peszticid szempontból hatékony mennyiségű vagy a kártevő megfékezésére elegendő mennyiségű fehérjét termel, amely peszticid vagy a kártevőt megfékező aktivitással rendelkezik.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

50. A 48. igénypont szerinti eljárás Zea mays növények megvédésére fitotoxikus vegyszerek hatásával szemben, *azzal jellemezve,* hogy a megvédendő Zea mays növényekbe a kukoricagenomba stabilan beépített exogén DNS-t viszünk be, és ez az exogén DNS kifejeződésekor a növényi sejtben a növény vegyszerekkel szemben kifejtett rezisztenciája növeléséhez elegendő koncentrációkban egy fehérjét fejez ki.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

51. A 48. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a patogének fitopatogén gombák, baktériumok és vírusok.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

52. Az 51. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a fitopatogén gombák elleni rezisztenciát olyan génnel biztosítjuk, amely a növényi sejtekben kitinázt fejez ki.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

53. A 49. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a kártevő Arthropod, ideértve a rovarokat, atkákat és férgeket.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

54. Az 53. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a kártevő egy rovar.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

55. Az 54. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a kártevőkkel szembeni rezisztenciát egy gén által biztosítjuk, amely a növényi sejtekben egy inszekticid hatású polipeptidet fejez ki a növénynek inszekticid tulajdonságokat biztosító koncentrációkban.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

56. Az 55. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett gén egy proteáz inhibitort kódol.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

57. Az 55. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a transzformált növényi sejt és a regenerált teljes növény, beleértve ezek utódait, a kódolt polipeptidet elegendő mennyiségben fejezi ki ahhoz, hogy a növényt nemkívánatossá tegye a rovarlárvák számára.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

58. Az 55. vagy 57. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az említett gén egy szintetikus DNS-t tartalmaz, amely egy Bacillus thüringiensis delta-endotoxin kristályos fehérjét vagy egy olyan fehérjét kódol, amely még rendelkezik az említett kristályos fehérje rovartoxikus tulajdonságaival.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

59. Az 58. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a delta-endotoxin kristályos fehérje Lepidoptera rovarokra toxikus.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

60. Az 58. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a delta-endotoxin kristályos fehérje Coleoptera rovarokra toxikus.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

61. Az 56. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a DNS egy CaMV 19S vagy 35S promoter kontrollja alatt áll.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

62. Az 50. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a vegyszer egy citotoxin.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

63. Az 50. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a vegyszer egy herbicid.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

64. Az 50. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a vegyszer egy inszekticid.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

65. A 62. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a citotoxinrezisztenciát egy olyan gén bevitelével biztosítjuk, amely a növényi sejtekben a citotoxint méregtelenítő enzimet fejez ki.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

66. A 63. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a herbicid egy triazin, karbamát, karbamid, dinitro-anilid, szulfonil-karbamid, imidazolinon, triazolo-pirimidin, bialafosz vagy glifozát.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

67. A 65. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az enzim II. típusú neomicin-foszfotranszferáz, IV. típusú aminoglikozid-foszfotranszferáz, glutation-S-transzferáz vagy citokróm P–450.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

68. A 62. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a citotoxinnal szembeni rezisztenciát egy gén által biztosítjuk, amely a növényben a célenzim citotoxinra rezisztens formáját fejezi ki.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

69. A 68. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy célenzimként az aceto-hidroxisav szintáz egy megváltozott formáját fejezzük ki, amely rezisztens a szulfonil-karbamid és/vagy imidazolinon vagy egyéb, ebben a metabolikus lépésben ható herbicidek általi gátlásra.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

70. A 68. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy célenzimként az 5-enol-piruvil-sikimát-3-foszfát (EPSP) szintáz egy megváltozott formáját fejezzük ki, amely nem érzékeny a glifozát általi gátlásra.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

71. A 47–70. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az exogén DNS a kukoricanövényekben aktív promoter és terminátor szignálok kontrollja alatt áll.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

72. A 71. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a promoter és/vagy terminátor szignálokat CaMV 19S vagy 35S promoterek és terminátorok közül választjuk ki.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

73. A 47–72. igénypontok szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az exogén DNS egy sejtkomponenst céloz meg.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

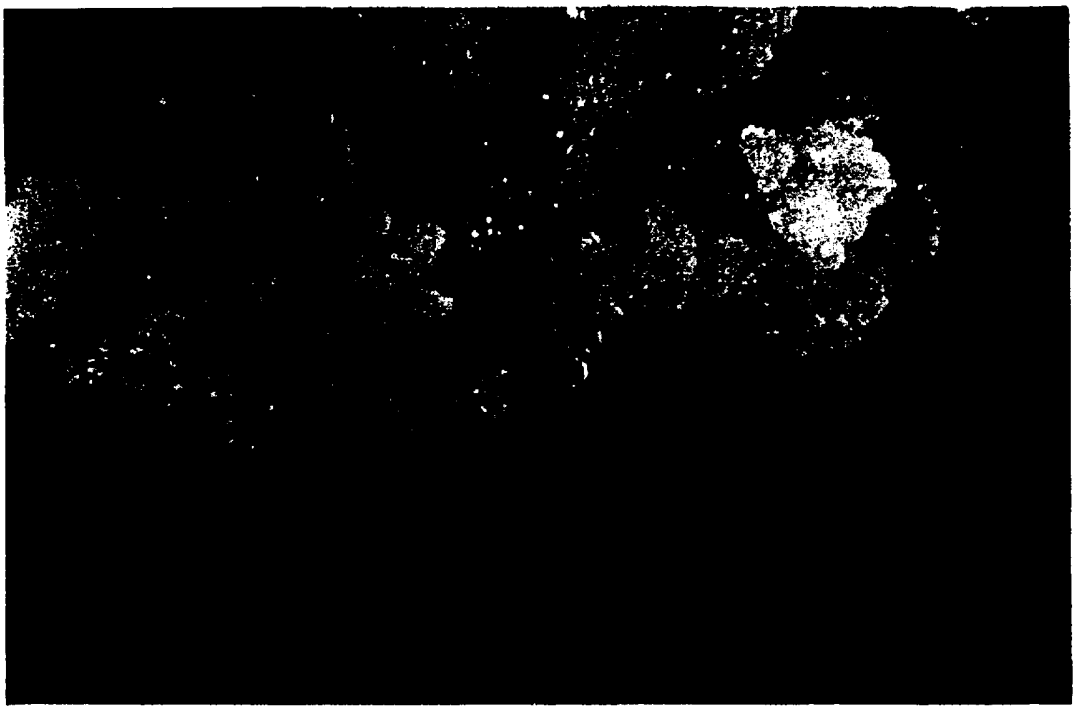
74. A 73. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a komponens a kloroplaszt.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

75. A 47. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a kukoricanövény egy Zea mays beltenyésztett vonal genotípusával rendelkezik.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

76. A 75. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a Zea mays genotípus egy elit Zea mays beltenyésztett vonal.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

77. A 76. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy elit Zea mays beltenyésztett vonalként az ATCC 40326 számú Funk 2717-et használjuk.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)

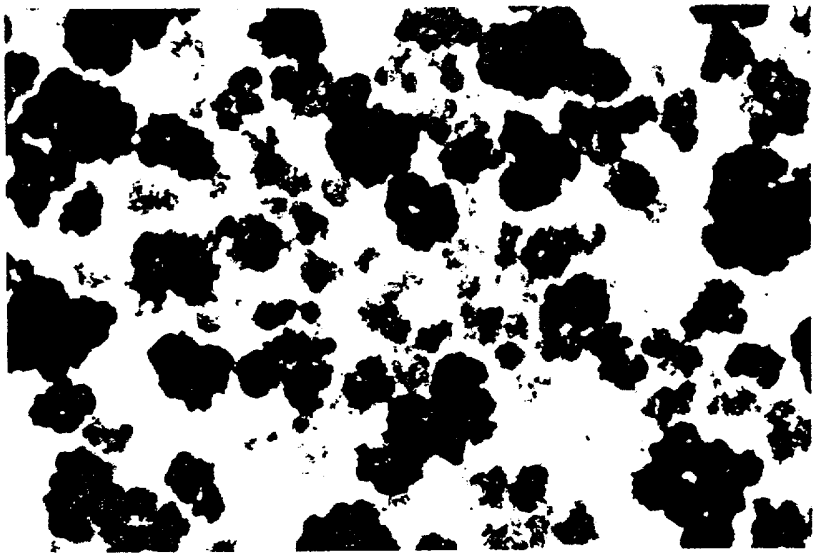
78. A 47–77. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy az exogén DNS nem tartalmazza egy Agrobacterium Ti plazmid T-DNS határszekvenciáját vagy ennek egy részét.
(Elsőbbsége: 1987. 05. 29.)



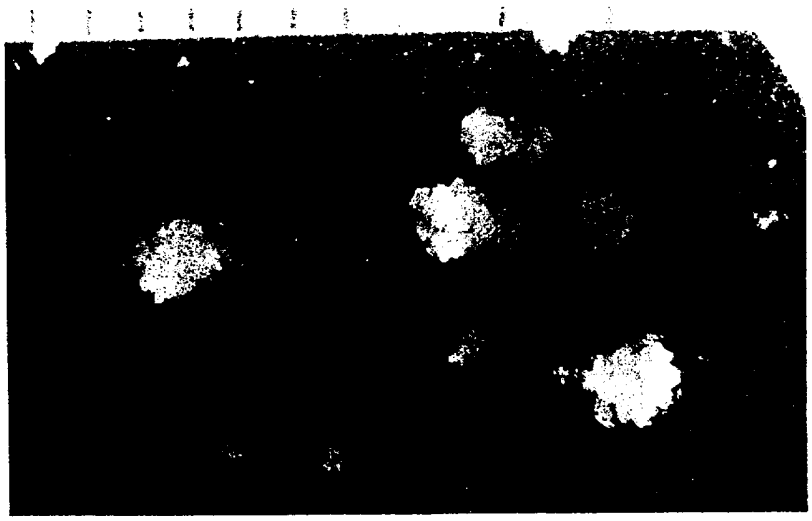
1. ábra



2. ábra



3. ábra



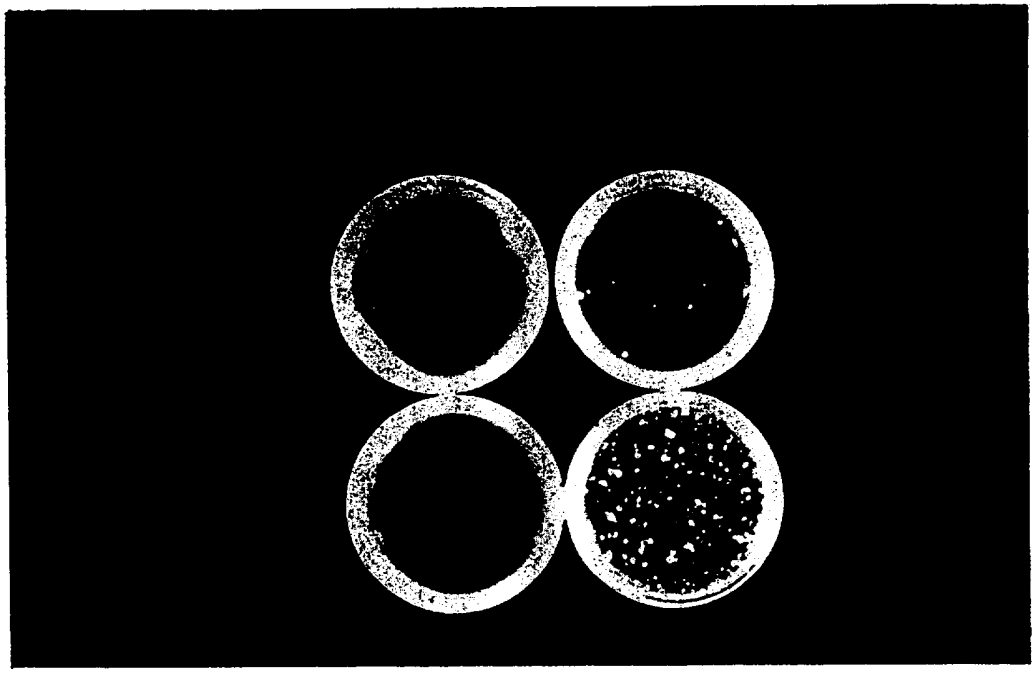
4. ábra



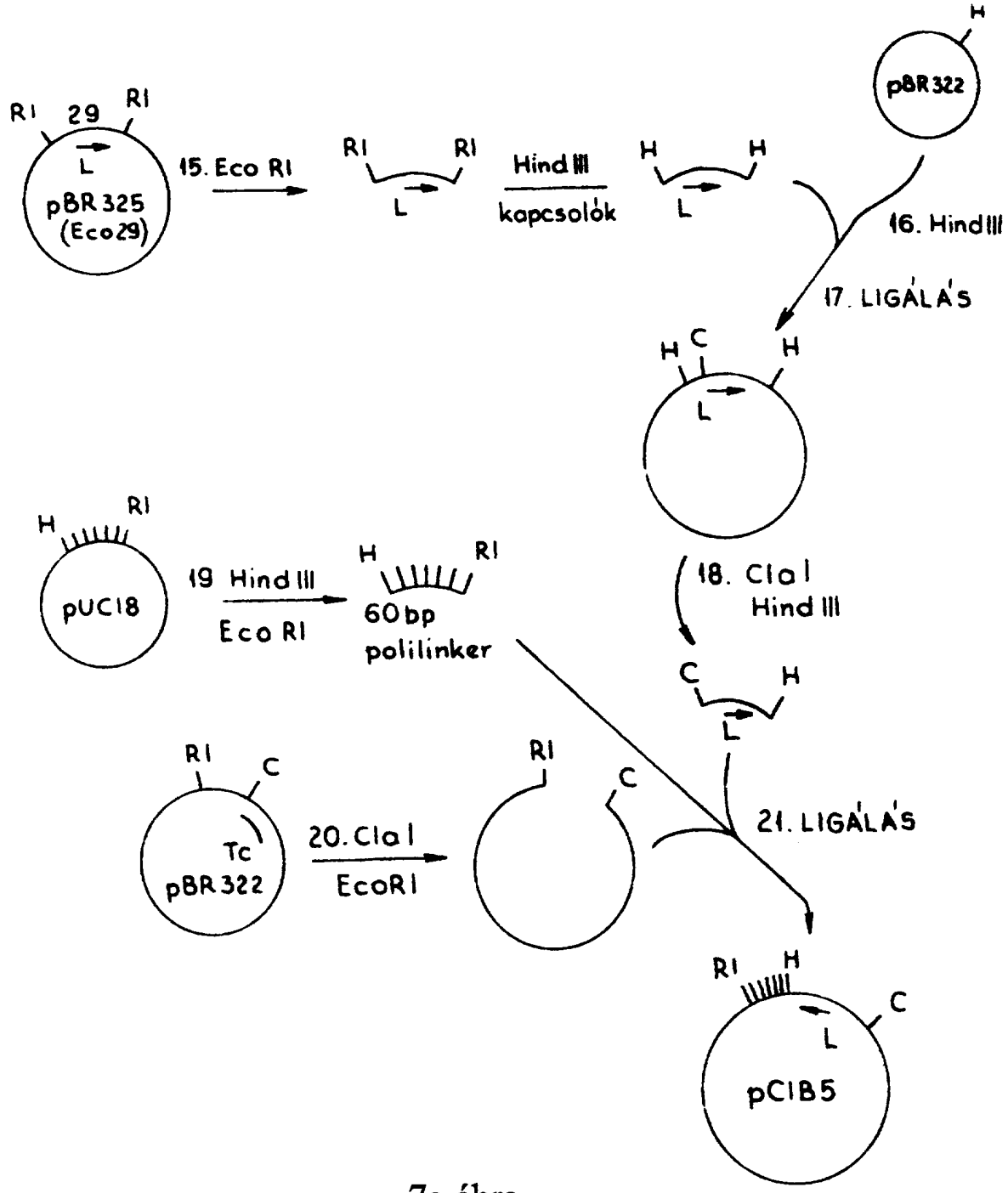
5. ábra



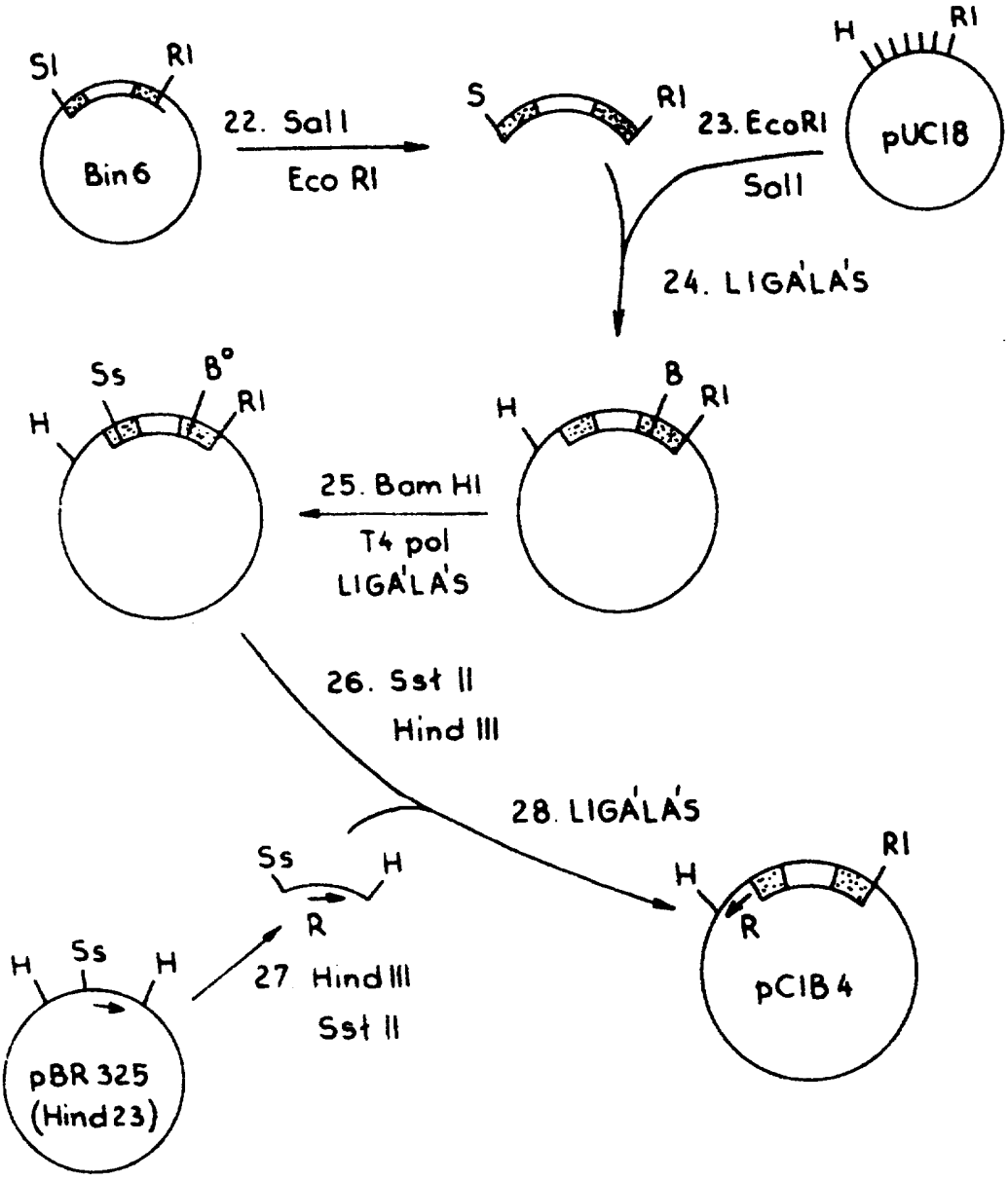
6. ábra



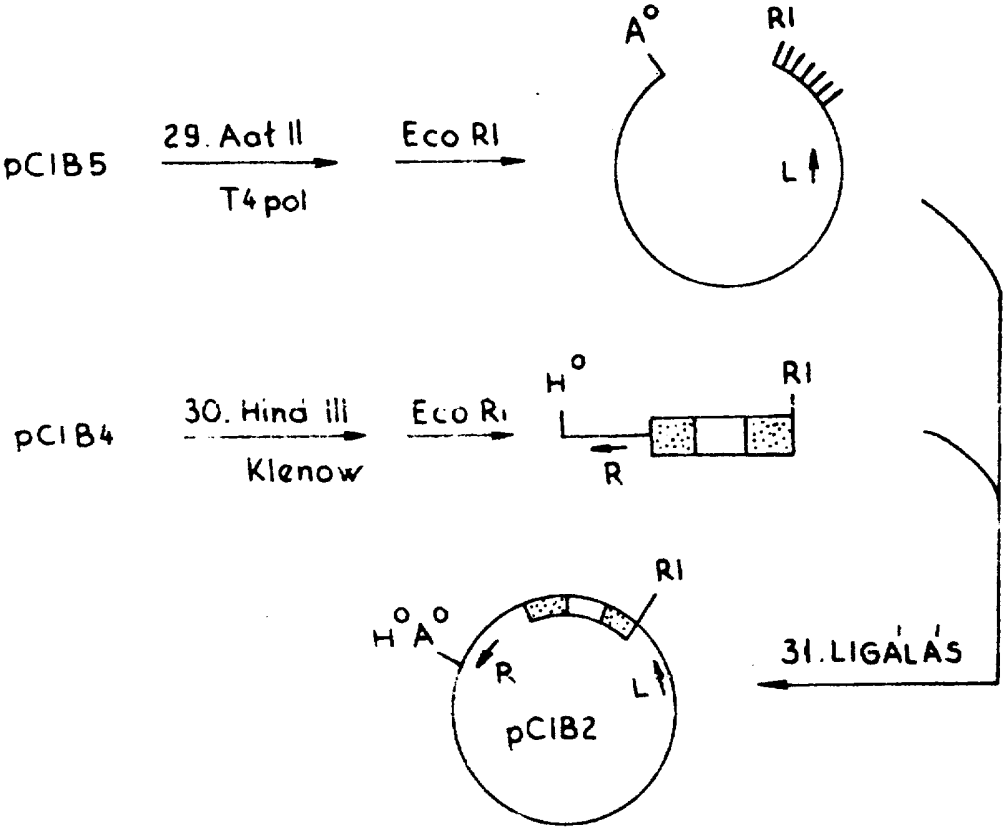
7. ábra


RI
29
RI
L
pBR325
(Eco29)
15. Eco RI
RI
RI
L
Hind III
kapcsolók
H
H
L
H
pBR322
16. Hind III
17. LIGÁLÁS
H
C
H
L
H
RI
pUC18
19 Hind III
Eco RI
H
RI
60bp
polilinker
18. Cla I
Hind III
C
H
L
RI
C
Tc
pBR322
20. Cla I
EcoRI
RI
C
21. LIGÁLÁS
RI
H
C
L
pCIB5

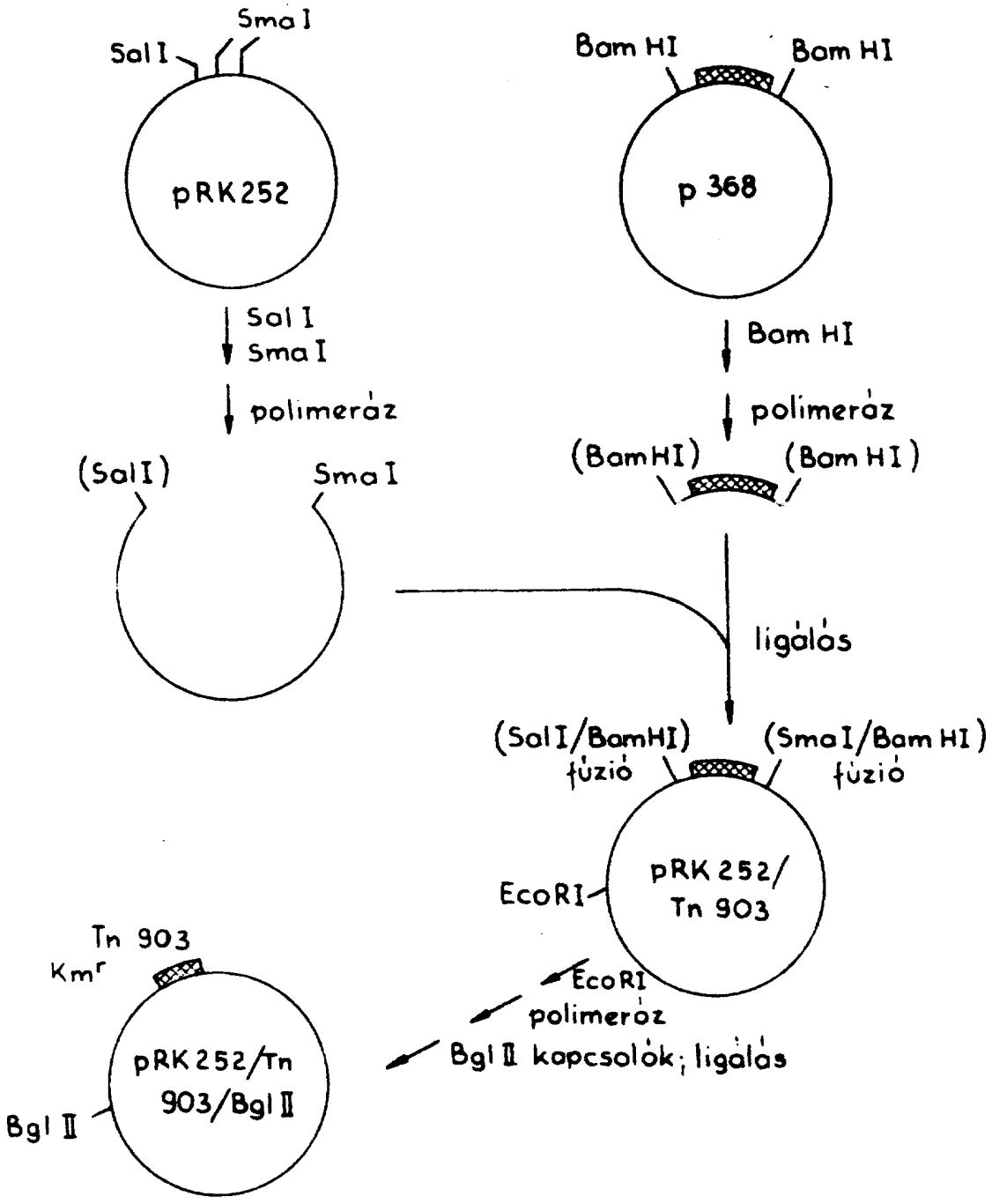
7a ábra


Sl
Rl
Bin6
22. Sall
Eco Rl
S
Rl
23. EcoRl
Soll
H
Rl
pUC18
24. LIGÁLÁS
Ss
B°
Rl
H
25. Bam Hl
T4 pol
LIGÁLÁS
B
Rl
H
26. Sst ll
Hind lll
28. LIGÁLÁS
Ss
H
R
H
Ss
H
27 Hind lll
Sst ll
pBR 325
(Hind23)
H
Rl
R
pCIB 4

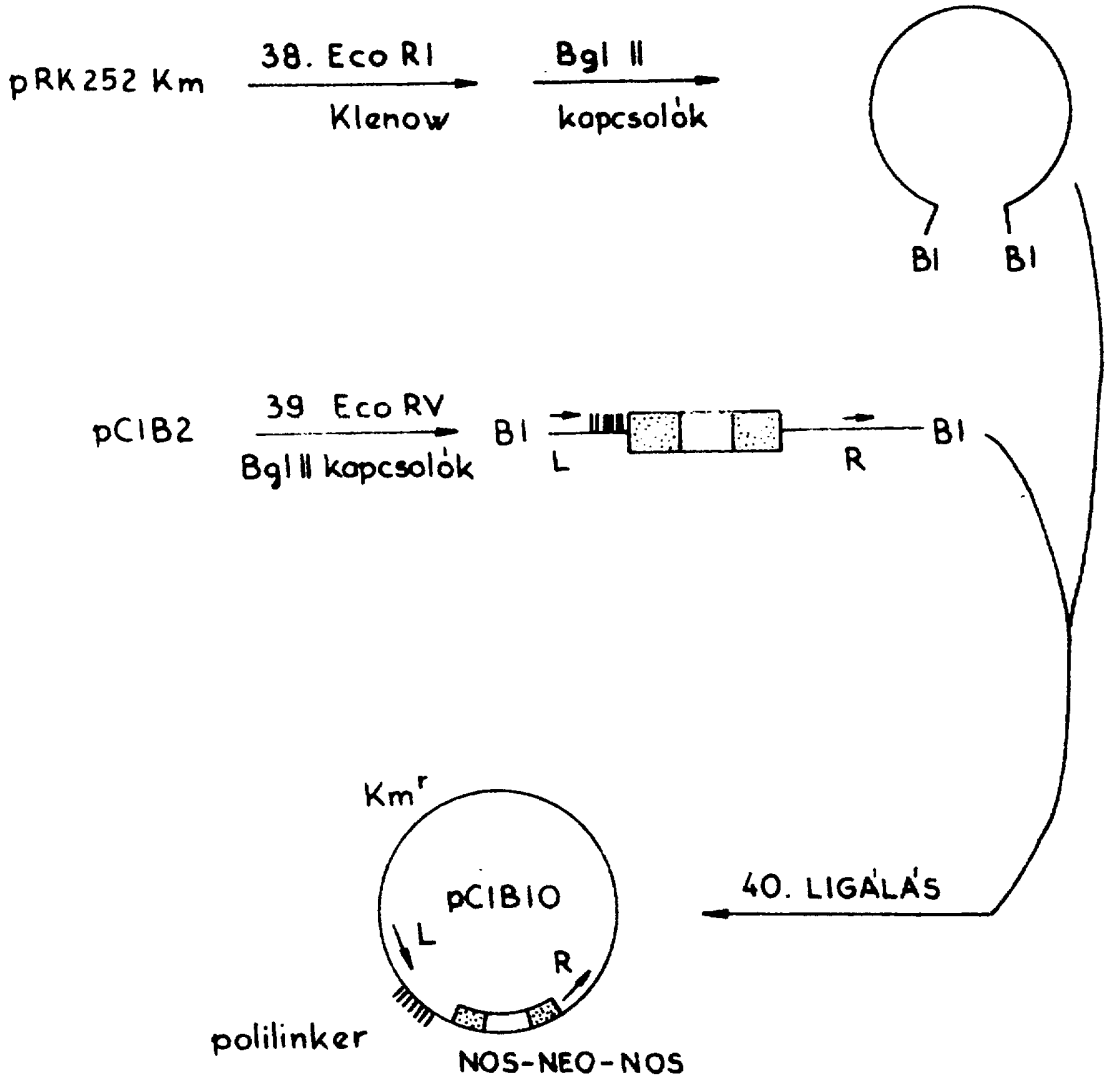
7b ábra


pCIB5
29. Aat II
T4 pol
Eco RI
A°
RI
L
pCIB4
30. Hind III
Klenow
Eco RI
H°
RI
R
H°A°
R
L
pCIB2
31. LIGÁLÁS

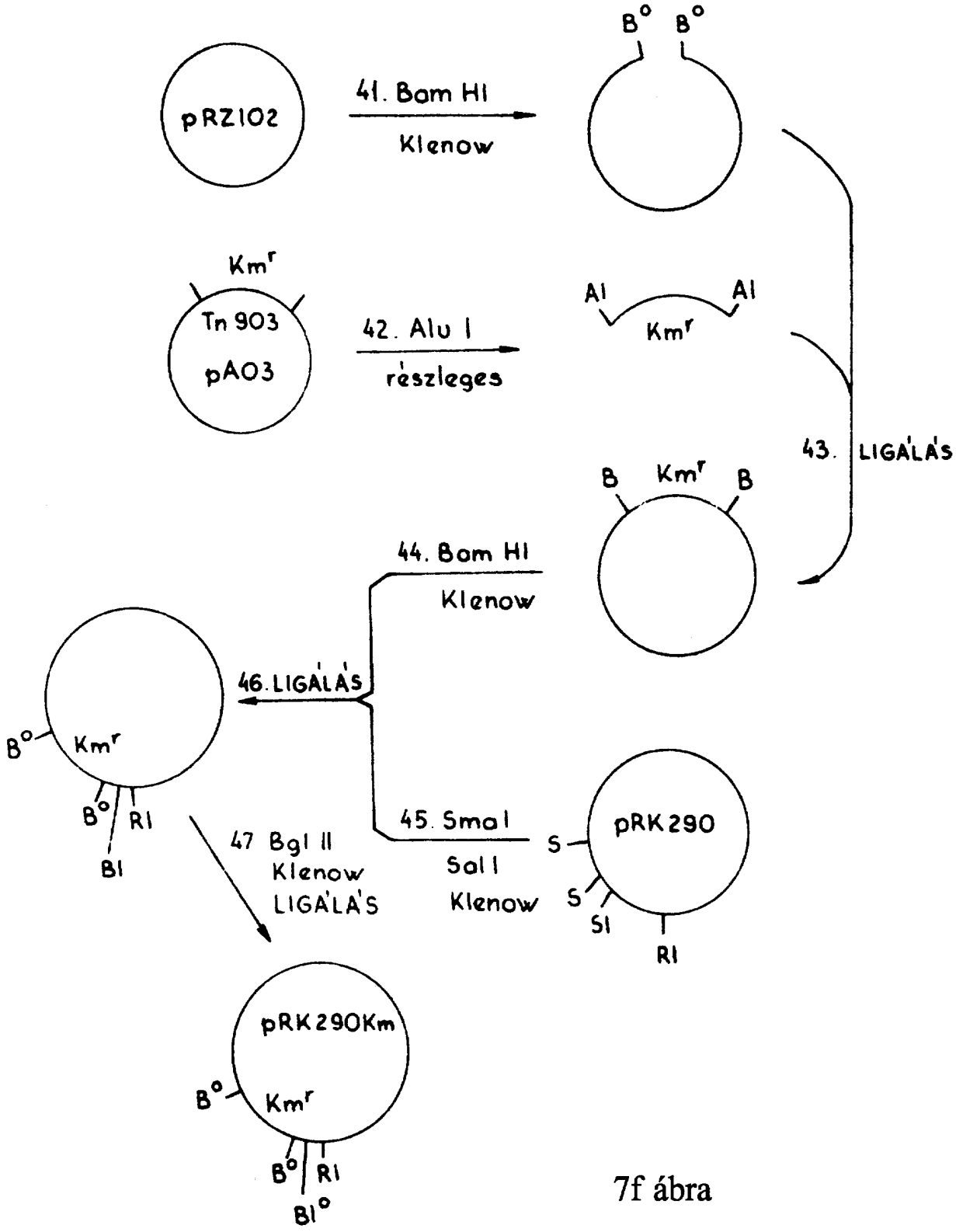
7c ábra


Sma I
Sal I
pRK252
Sal I
Sma I
polimeráz
(Sal I)
Sma I
Bam HI
Bam HI
p 368
Bam HI
polimeráz
(Bam HI)
(Bam HI)
ligálás
(Sal I/Bam HI)
fúzió
(Sma I/Bam HI)
fúzió
pRK 252/
Tn 903
EcoRI
EcoRI
polimeráz
Bgl II kapcsolók; ligálás
Tn 903
Km^r
pRK 252/Tn
903/Bgl II
Bgl II

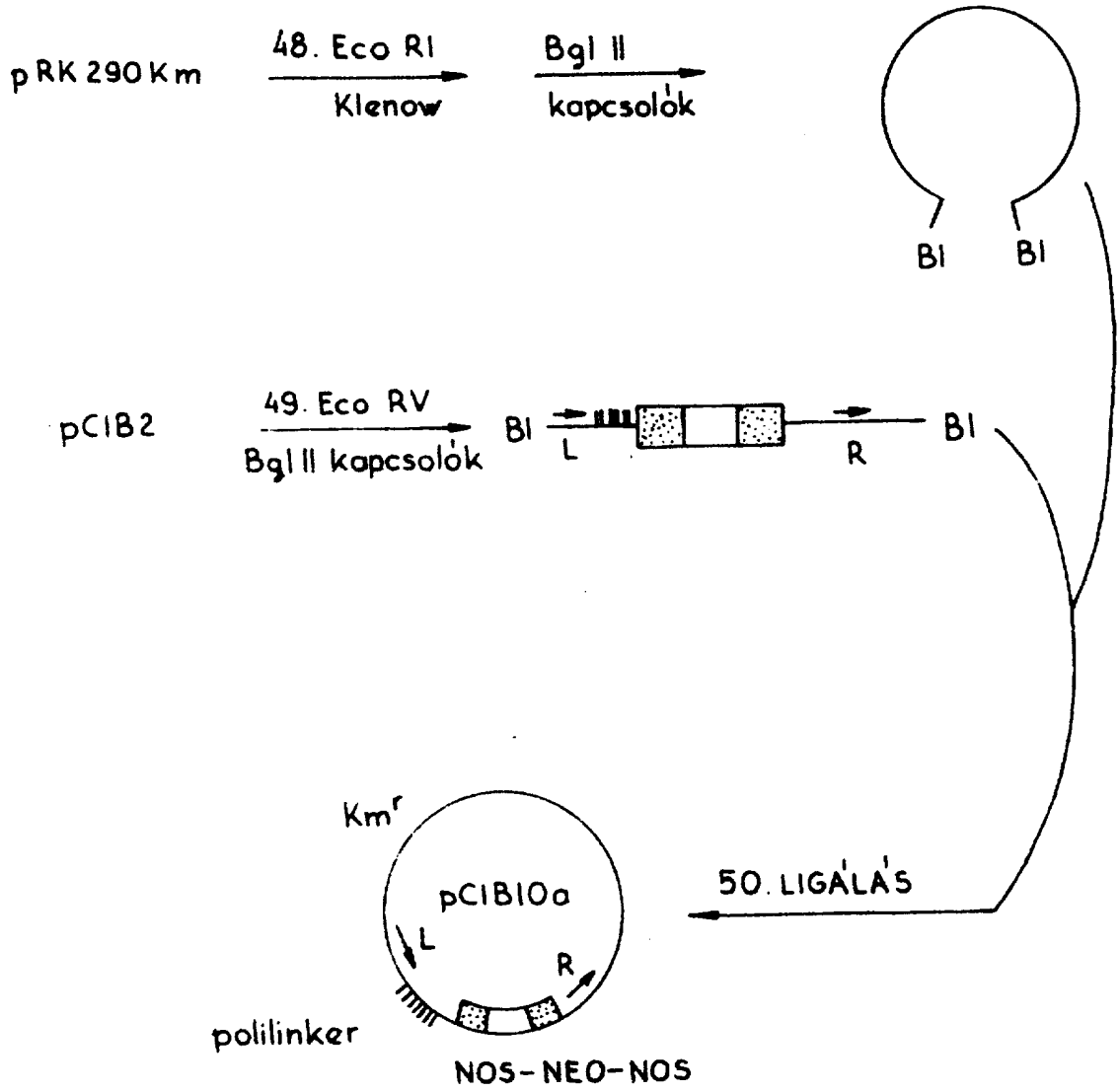
7d ábra


pRK 252 Km
38. Eco RI
Klenow
Bgl II
kopcsolók
BI
BI
pCIB2
39 Eco RV
Bgl II kopcsolók
BI
L
R
BI
Km^r
pCIB10
L
R
polilinker
NOS-NEO-NOS
40. LIGÁLÁS

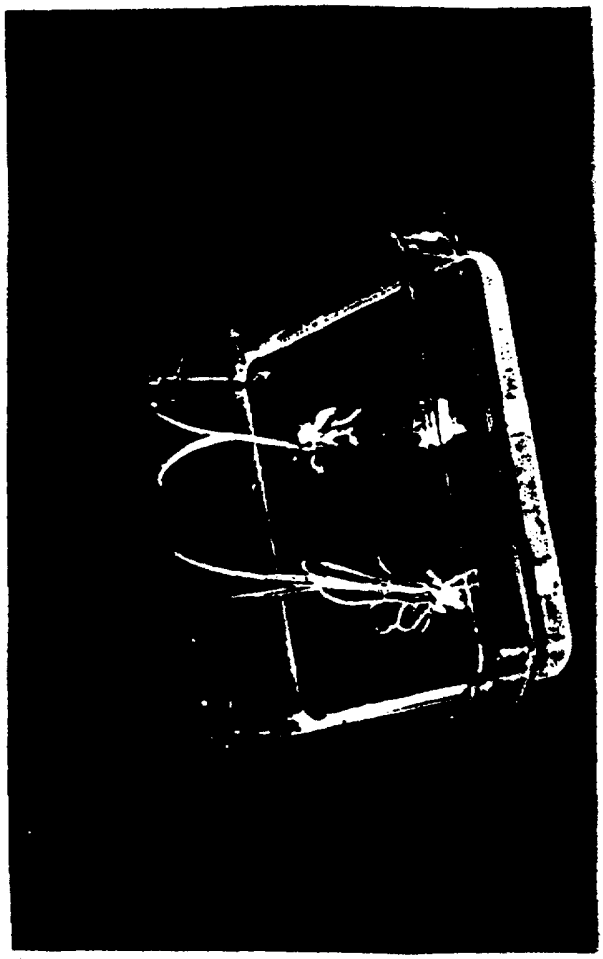
7e ábra


pRZ102
41. Bam HI
Klenow
B° B°
Km^r
Tn 903
pAO3
42. Alu I
részleges
Al Al
Km^r
43. LIGÁLÁS
B Km^r B
44. Bam HI
Klenow
46. LIGÁLÁS
B° Km^r
B° RI
BI
47 Bgl II
Klenow
LIGÁLÁS
45. SmaI
SalI
Klenow
pRK290
S
S
SI
RI
pRK290Km
B° Km^r
B° RI
BI°

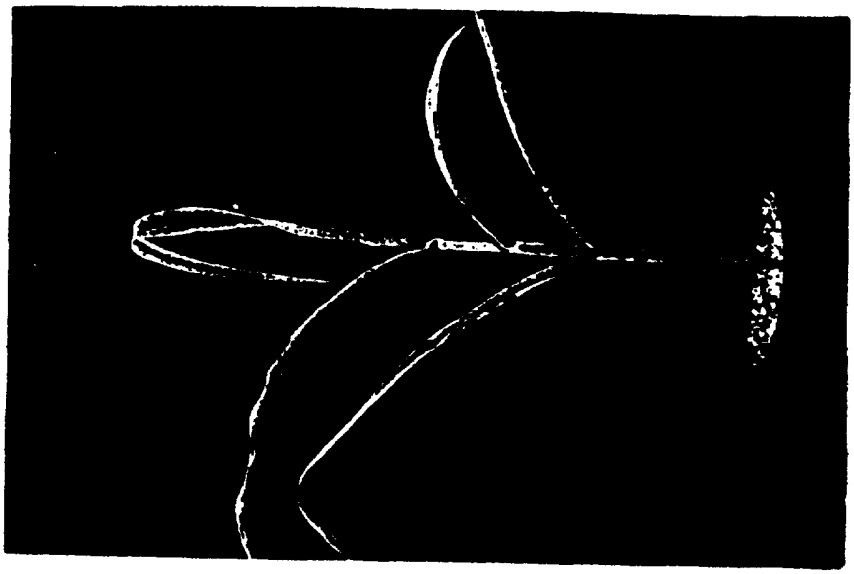
7f ábra


pRK 290 Km
48. Eco RI
Klenow
Bgl II
kapcsolók
Bl
Bl
pCIB2
49. Eco RV
Bgl II kapcsolók
Bl
L
R
Bl
Km^r
pCIB10a
L
R
polilinker
NOS-NEO-NOS
50. LIGÁLÁS

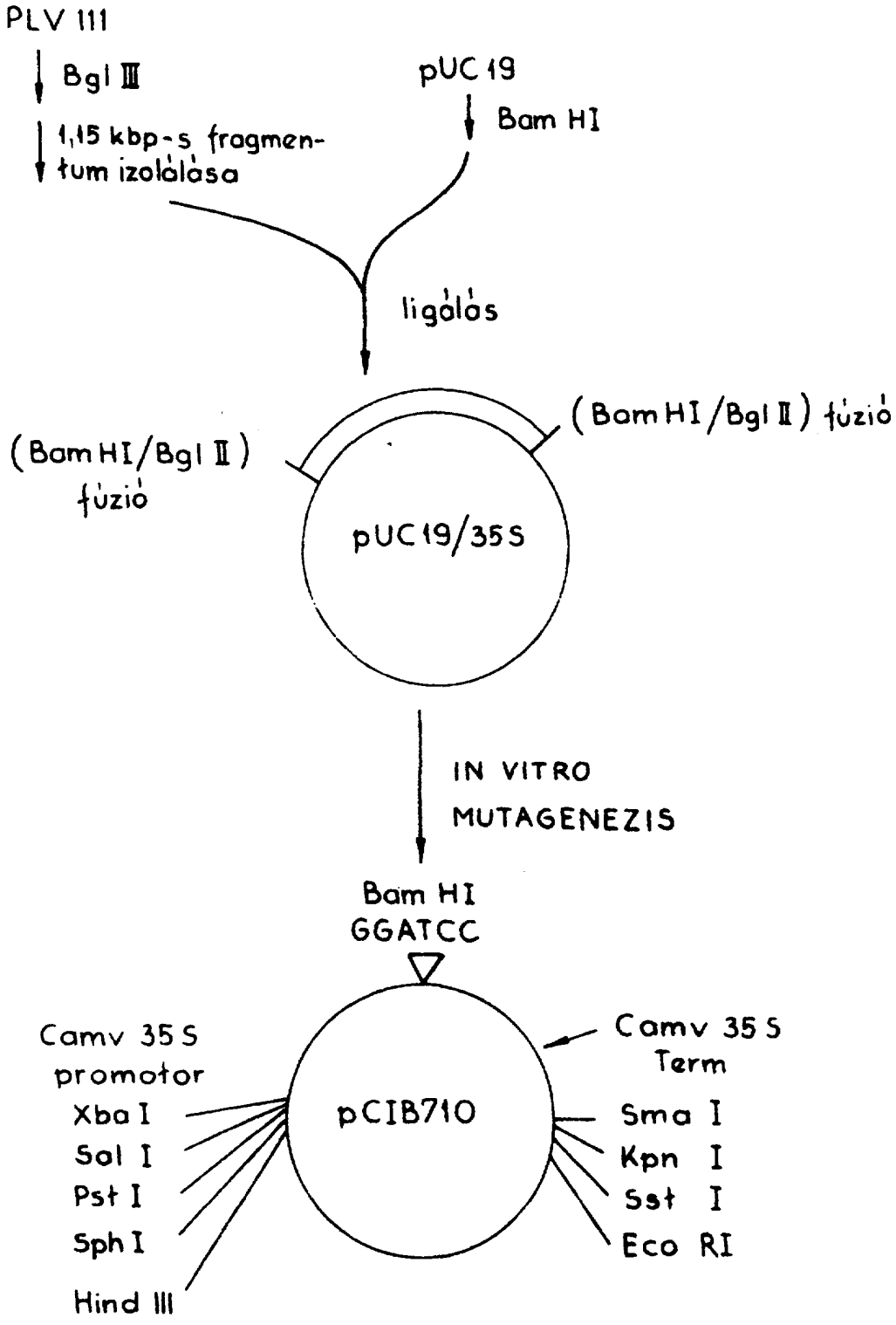
7g ábra



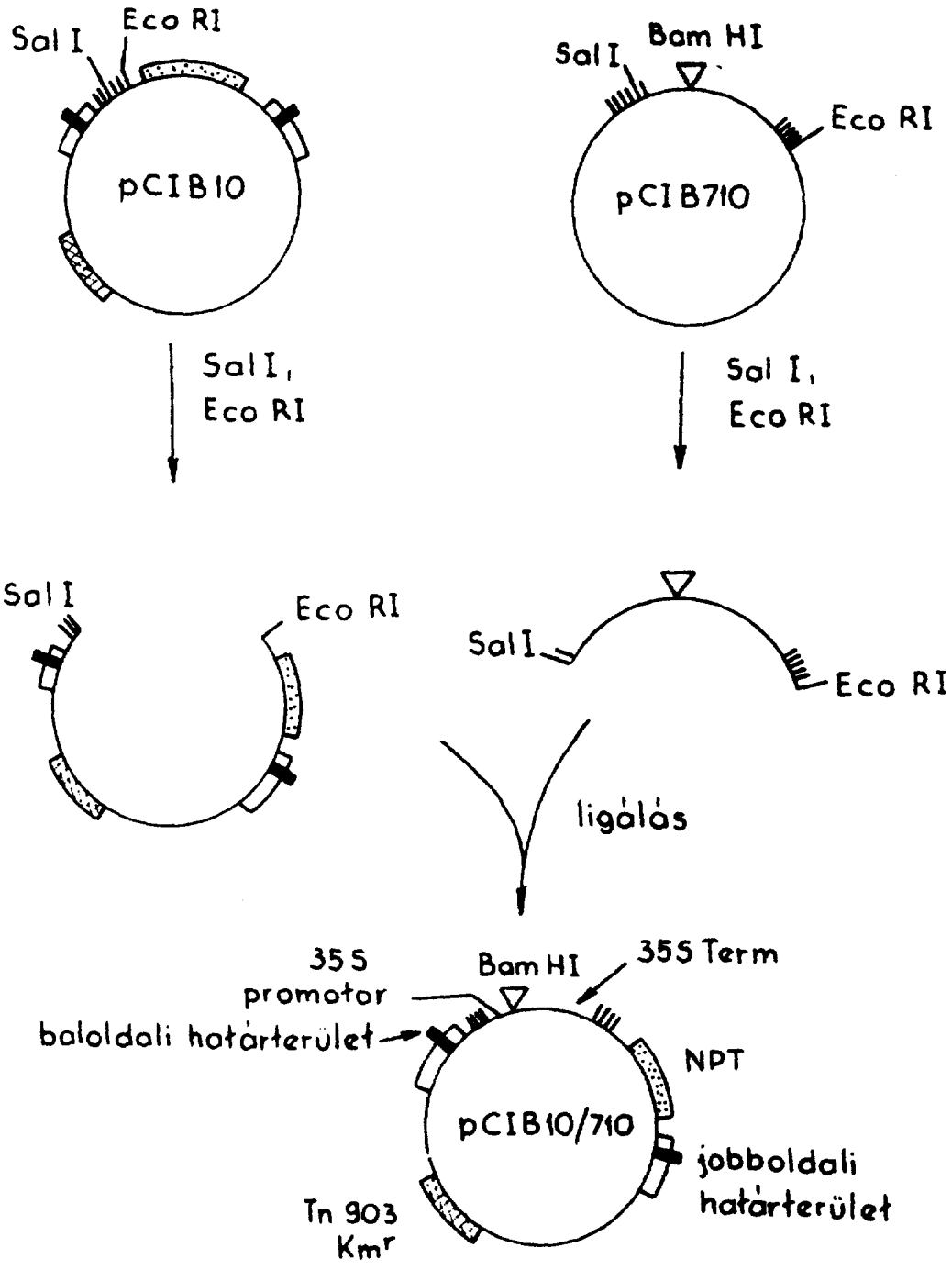
8. ábra



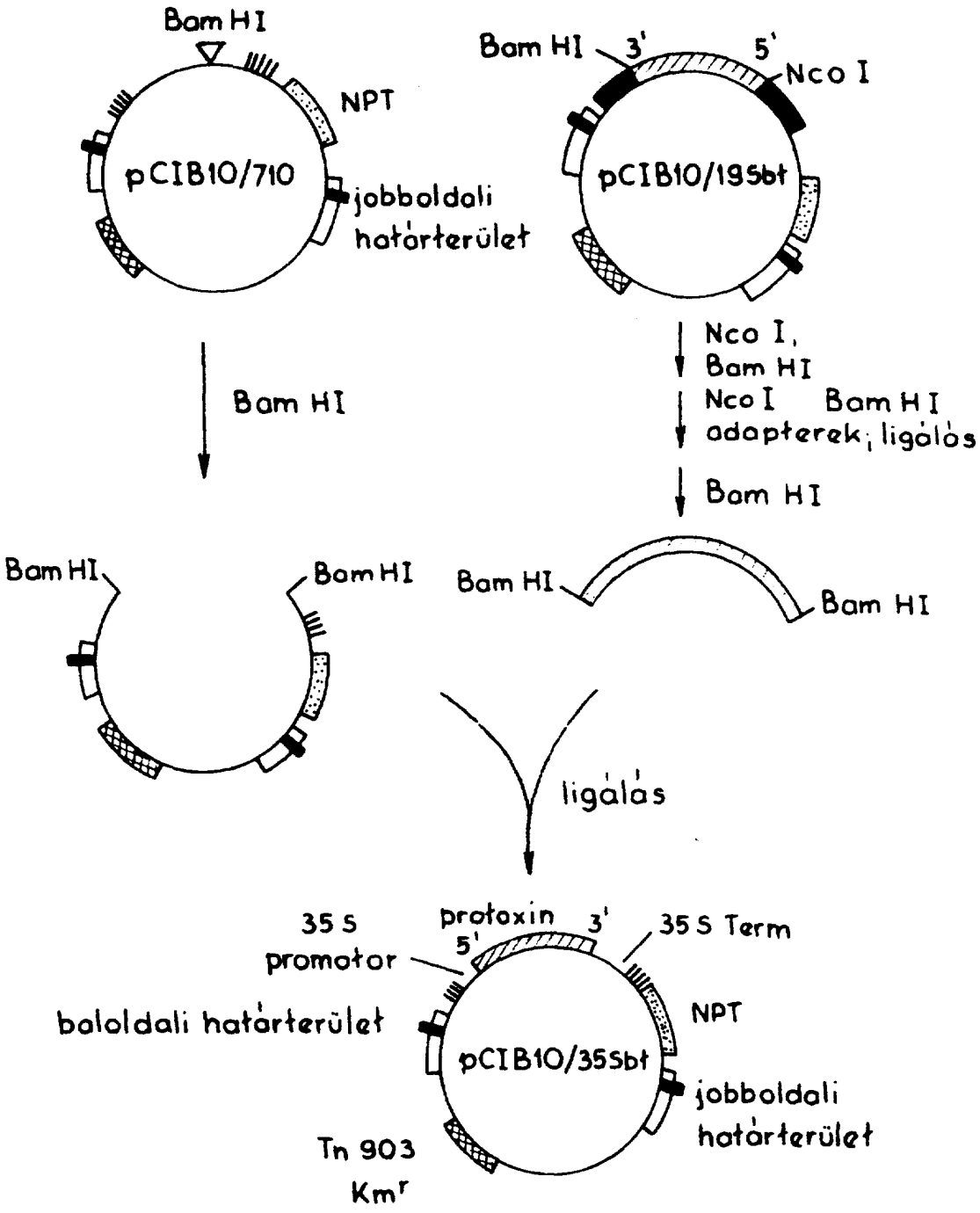
9. ábra


PLV 111
Bgl III
1,15 kbp-s fragmentum izolálása
pUC 19
Bam HI
ligálás
(Bam HI/Bgl II) fúzió
(Bam HI/Bgl II) fúzió
pUC19/35S
IN VITRO MUTAGENEZIS
Bam HI
GGATCC
Camv 35 S promotor
Xba I
Sal I
Pst I
Sph I
Hind III
pCIB710
Camv 35 S Term
Sma I
Kpn I
Sst I
Eco RI

10. ábra


Sal I
Eco RI
pCIB10
Sal I,
Eco RI
Sal I
Bam HI
Eco RI
pCIB710
Sal I,
Eco RI
Sal I
Eco RI
Sal I
Eco RI
ligálás
35 S
promotor
Bam HI
35S Term
baloldali határterület
NPT
pCIB10/710
jobboldali
határterület
Tn 903
Km[r]

11. ábra


Bam HI
NPT
pCIB10/710
jobboldali határterület
Bam HI
3'
5'
Nco I
pCIB10/195bt
Nco I,
Bam HI
Nco I Bam HI
adapterek; ligálás
Bam HI
Bam HI
Bam HI
Bam HI
Bam HI
Bam HI
ligálás
35 S promotor
protoxin
5'
3'
35 S Term
baloldali határterület
NPT
pCIB10/355bt
jobboldali határterület
Tn 903
Km[r]

12. ábra

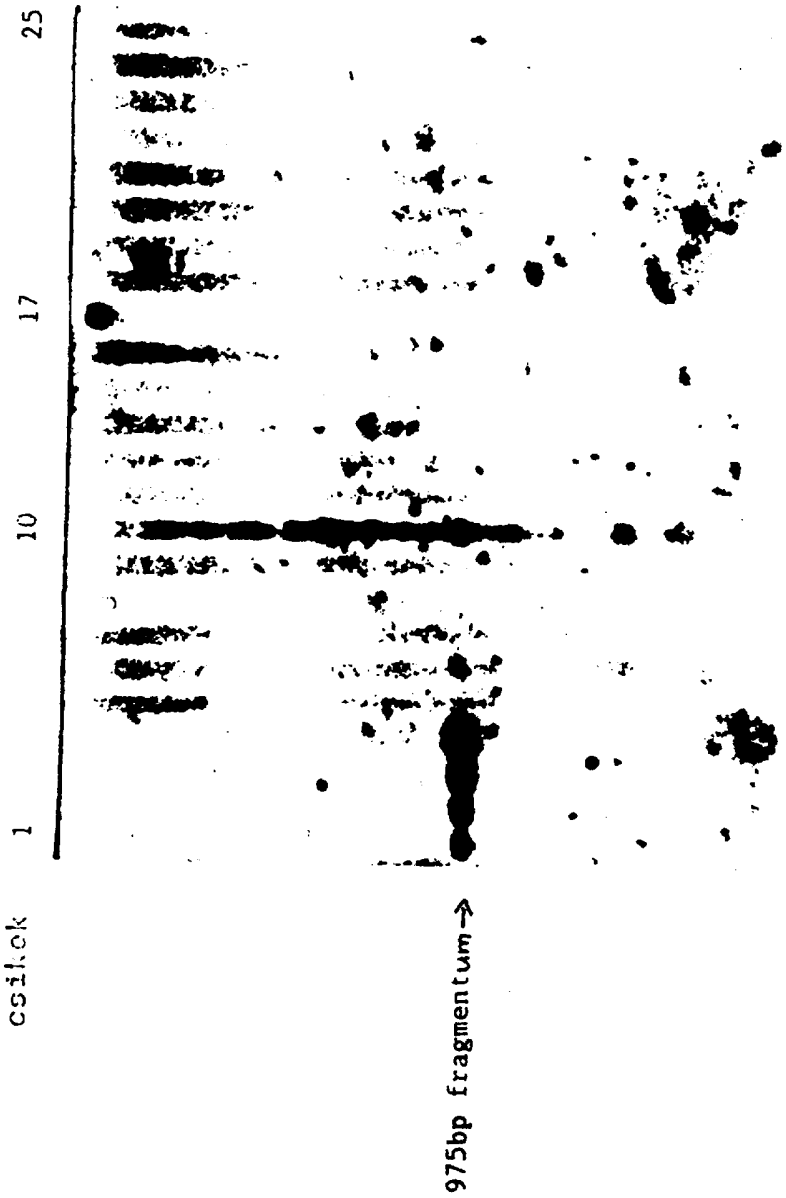
13. ábra

I. képlet

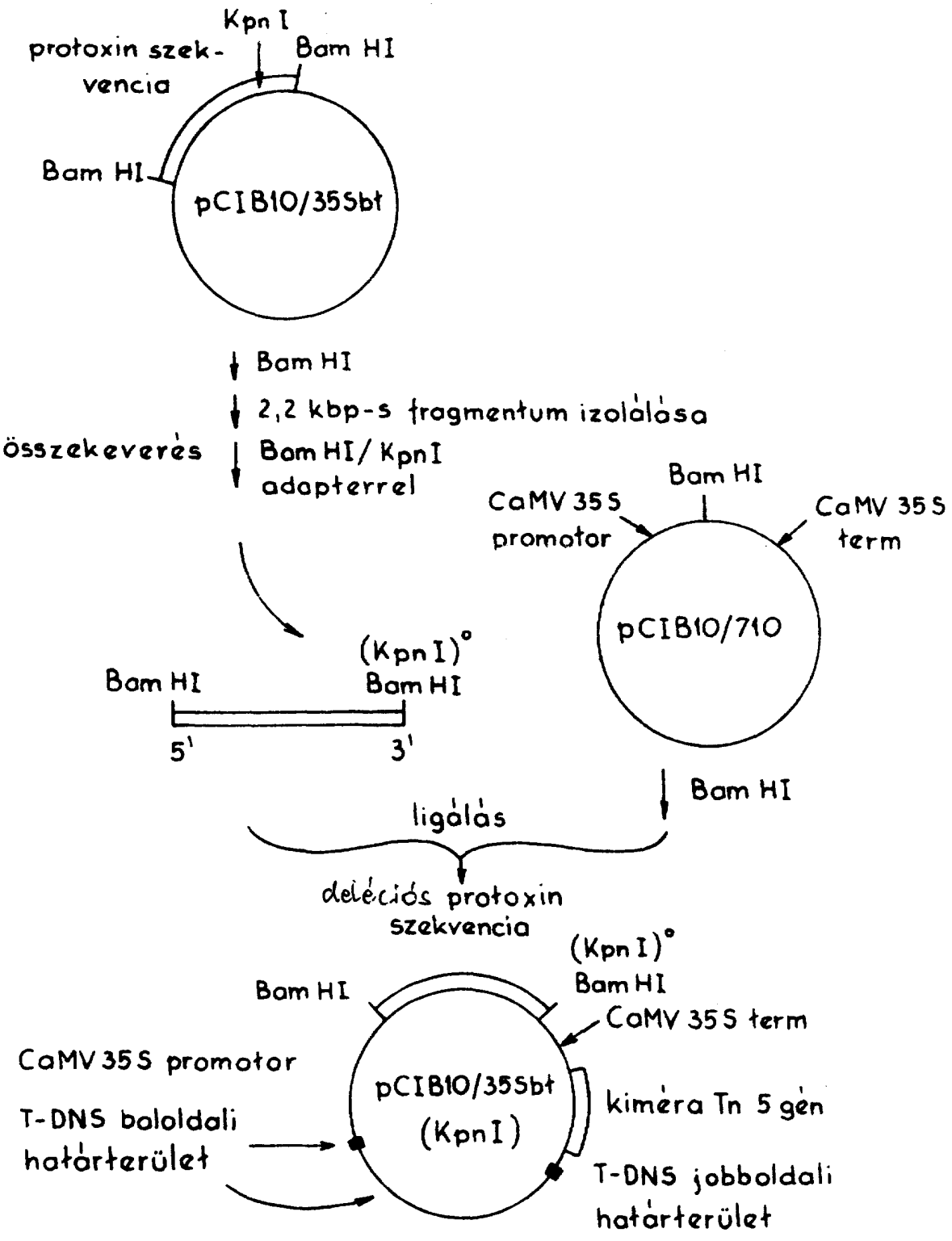
```
   1  GTTAACACCC TGGGTCAAAA ATTGATATTT AGTAAAATTA GTTGCACTTT
  51  GTGCATTTTT TCATAAGATG AGTCATATGT TTTAAATTGT AGTAATGAAA
 101  AACAGTATTA TATCATAATG AATTGGTATC TTAATAAAAG AGATGGAGGT
 151  AACTTATGGA TAACAATCCG AACATCAATG AATGCATTCC TTATAATTGT
 201  TTAAGTAACC CTGAAGTAGA AGTATTAGGT GGAGAAAGAA TAGAAACTGG
 251  TTACACCCCA ATCGATATTT CCTTGTCGCT AACGCAATTT CTTTTGAGTG
 301  AATTTGTTCC CGGTGCTGGA TTTGTGTTAG GACTAGTTGA TATAATATGG
 351  GGAATTTTTG GTCCCTCTCA ATGGGACGCA TTTCTTGTAC AAATTGAACA
 401  GTTAATTAAC CAAAGAATAG AAGAATTCGC TAGGAACCAA GCCATTTCTA
 451  GATTAGAAGG ACTAAGCAAT CTTTATCAAA TTTACGCAGA ATCTTTTAGA
 501  GAGTGGGAAG CAGATCCTAC TAATCCAGCA TTAAGAGAAG AGATGCGTAT
 551  TCAATTCAAT GACATGAACA GTGCCCTTAC AACCGCTATT CCTCTTTTTG
 601  CAGTTCAAAA TTATCAAGTT CCTCTTTTAT CAGTATATGT TCAAGCTGCA
 651  AATTTACATT TATCAGTTTT GAGAGATGTT TCAGTGTTTG GACAAAGGTG
 701  GGGATTTGAT GCCGCGACTA TCAATAGTCG TTATAATGAT TTAACTAGGC
 751  TTATTGGCAA CTATACAGAT CATGCTGTAC GCTGGTACAA TACGGGATTA
 801  GAGCGTGTAT GGGGACCGGA TTCTAGAGAT TGGATAAGAT ATAATCAATT
 851  TAGAAGAGAA TTAACACTAA CTGTATTAGA TATCGTTTCT CTATTTCCGA
 901  ACTATGATAG TAGAACGTAT CCAATTCGAA CAGTTTCCCA ATTAACAAGA
 951  GAAATTTATA CAAACCCAGT ATTAGAAAAT TTTGATGGTA GTTTTCGAGG
1001  CTCGGCTCAG GGCATAGAAG GAAGTATTAG GAGTCCACAT TTGATGGATA
1051  TACTTAACAG TATAACCATC TATACGGATG CTCATAGAGG AGAATATTAT
1101  TGGTCAGGGC ATCAAATAAT GGCTTCTCCT GTAGGGTTTT CGGGGCCAGA
1151  ATTCACTTTT CCGCTATATG GAACTATGGG AAATGCAGCT CCACAACAAC
1201  GTATTGTTGC TCAACTAGGT CAGGGCGTGT ATAGAACATT ATCGTCCACT
1251  TTATATAGAA GACCTTTTAA TATAGGGATA AATAATCAAC AACTATCTGT
1301  TCTTGACGGG ACAGAATTTG CTTATGGAAC CTCCTCAAAT TTGCCATCCG
1351  CTGTATACAG AAAAAGCGGA ACGGTAGATT CGCTGGATGA AATACCGCCA
1401  CAGAATAACA ACGTGCCACC TAGGCAAGGA TTTAGTCATC GATTAAGCCA
1451  TGTTTCAATG TTTCGTTCAG GCTTTAGTAA TAGTAGTGTA AGTATAATAA
```

1501 GAGCTCCTAT GTTCTCTTGG ATACATCGTA GTGCTCAATT TAATAATATA
1551 ATTCCTTCAT CACAAATTAC ACAAATACCT TTAACAAAAT CTACTAATCT
1601 TGGCTCTGGA ACTTCTGTCG TTAAAGGACC AGGATTTACA GGAGGACATA
1651 TTCTTCGAAG AACTTCACCT GGCCAGATTT CAACCTTAAG AGTAAATATT
1701 ACTGCACCAT TATCACAAAG ATATCGGGTA AGAATTCGCT ACGCTTCTAC
1751 CACAAATTTA CAATTCCATA CATCAATTGA CGGAAGACCT ATTAATCAGG
1801 GGAATTTTTC AGCAACTATG AGTAGTGGGA GTAATTTACA GTCCGGAAGC
1851 TTTAGGACTG TAGGTTTTAC TACTCCGTTT AACTTTTCAA ATGGATCAAG
1901 TGTATTTACG TTAAGTGCTC ATGTCTTCAA TTCAGGCAAT GAAGTTTATA
1951 TAGATCGAAT TGAATTTGTT CCGGCAGAAG TAACCTTTGA GGCAGAATAT
2001 GATTTAGAAA GAGCACAAAA GGCGGTGAAT GAGCTGTTTA CTTCTTCCAA
2051 TCAAATCGGG TTAAAAACAG ATGTGACGGA TTATCATATT GATCAAGTAT
2101 CCAATTTAGT TGAGTGTTTA TCTGATGAAT TTTGTCTGGA TGAAAAAAAA
2151 GAATTGTCCG AGAAAGTCAA ACATGCGAAG CGACTTAGTG ATGAGCGGAA
2201 TTTACTTCAA GATCCAAACT TTAGAGGGAT CAATAGACAA CTAGACCGTG
2251 GCTGGAGAGG AAGTACGGAT ATTACCATCC AAGGAGGCGA TGACGTATTC
2301 AAAGAGAATT ACGTTACGCT ATTGGGTACC TTTGATGAGT GCTATCCAAC
2351 GTATTTATAT CAAAAAATAG ATGAGTCGAA ATTAAAAGCC TATACCCGTT
2401 ACCAATTAAG AGGGTATATC GAAGATAGTC AAGACTTAGA AATCTATTTA
2451 ATTCGCTACA ATGCCAAACA CGAAACAGTA AATGTGCCAG GTACGGGTTC
2501 CTTATGGCCG CTTTCAGCCC CAAGTCCAAT CGGAAAATGT GCCCATCATT
2551 CCCATCATTT CTCCTTGGAC ATTGATGTTG GATGTACAGA CTTAAATGAG
2601 GACTTAGGTG TATGGGTGAT ATTCAAGATT AAGACGCAAG ATGGCCATGC
2651 AAGACTAGGA AATCTAGAAT TTCTCGAAGA GAAACCATTA GTAGGAGAAG
2701 CACTAGCTCG TGTGAAAAGA GCGGAGAAAA AATGGAGAGA CAAACGTGAA
2751 AAATTGGAAT GGGAAACAAA TATTGTTTAT AAAGAGGCAA AAGAATCTGT
2801 AGATGCTTTA TTTGTAAACT CTCAATATGA TAGATTACAA GCGGATACCA
2851 ACATCGCGAT GATTCATGCG GCAGATAAAC GCGTTCATAG CATTCGAGAA
2901 GCTTATCTGC CTGAGCTGTC TGTGATTCCG GGTGTCAATG CGGCTATTTT
2951 TGAAGAATTA GAAGGGCGTA TTTTCACTGC ATTCTCCCTA TATGATGCGA
3001 GAAATGTCAT TAAAAATGGT GATTTTAATA ATGGCTTATC CTGCTGGAAC
3051 GTGAAAGGGC ATGTAGATGT AGAAGAACAA AACAACCACC GTTCGGTCCT
3101 TGTTGTTCCG GAATGGGAAG CAGAAGTGTC ACAAGAAGTT CGTGTCTGTC

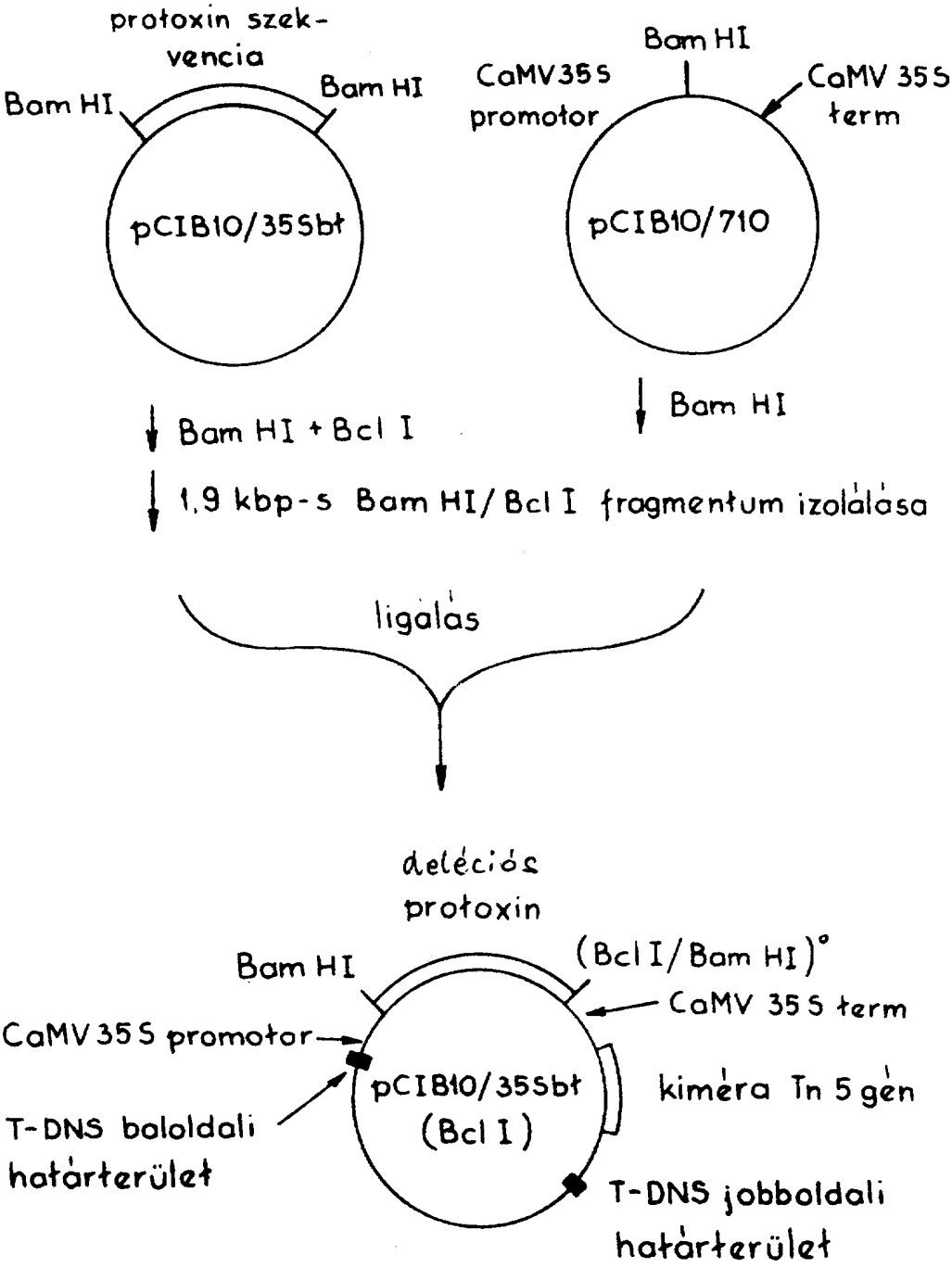
3151 AGGCTTCGTGG CTATATCCTT CCTGTCACAG CGTACAAGCA GGGATATGGA
3201 GAAGGTTGCG TAACCATTCA TGAGATCGAG AACAATACAG ACGAACTGAA
3251 GTTTAGCAAC TGTGTAGAAG AGGAAGTATA TCCAAACAAC ACGGTAACGT
3301 GTAATGATTA TACTGCGACT CAAGAAGAAT ATGAGGGTAC GTACACTTCT
3351 CGTAATCGAG GATATGACGG AGCCTATGAA AGCAATTCTT CTGTACCAGC
3401 TGATTATGCA TCAGCCTATG AAGAAAAAGC ATATACAGAT GGACGAAGAG
3451 ACAATCCTTG TGAATCTAAC AGAGGATATG GGGATTACAC ACCACTACCA
3501 GCTGGCTATG TGACAAAAGA ATTAGAGTAC TTCCCAGAAA CCGATAAGGT
3551 ATGGATTGAG ATCGGAGAAA CGGAAGGAAC ATTCATCGTG GACAGCGTGG
3601 AATTACTTCT TATGGAGGAA TAATATATGC TTTATAATGT AAGGTGTGCA
3651 AATAAAGAAT GATTACTGAC TTGTATTGAC AGATAAATAA GGAAATTTTT
3701 ATATGAATAA AAAACGGGCA TCACTCTTAA AAGAATGATG TCCGTTTTTT
3751 GTATGATTTA ACGAGTGATA TTTAAATGTT TTTTTGCGA AGGCTTTACT
3801 TAACGGGGTA CCGCCACATG CCCATCAACT TAAGAATTTG CACTACCCCC
3851 AAGTGTCAAA AAACGTTATT CTTTCTAAAA AGCTAGCTAG AAAGGATGAC
3901 ATTTTTTATG AATCTTTCAA TTCAAGATGA ATTACAACTA TTTTCTGAAG
3951 AGCTGTATCG TCATTTAACC CCTTCTCTTT TGGAAGAACT CGCTAAAGAA
4001 TTAGGTTTTG TAAAAAGAAA ACGAAAGTTT TCAGGAAATG AATTAGCTAC
4051 CATATGTATC TGGGGCAGTC AACGTACAGC GAGTGATTCT CTCGTTCGAC
4101 TATGCAGTCA ATTACACGCC GCCACAGCAC TCTTATGAGT CCAGAAGGAC
4151 TCAATAAACG CTTTGATAAA AAAGCGGTTG AATTTTTGAA ATATATTTTT
4201 TCTGCATTAT GGAAAAGTAA ACTTTGTAAA ACATCAGCCA TTTCAAGTGC
4251 AGCACTCACG TATTTTCAAC GAATCCGTAT TTTAGATGCG ACGATTTTCC
4301 AAGTACCGAA ACATTTAGCA CATGTATATC CTGGGTCAGG TGGTTGTGCA
4351 CAAACTGCAG



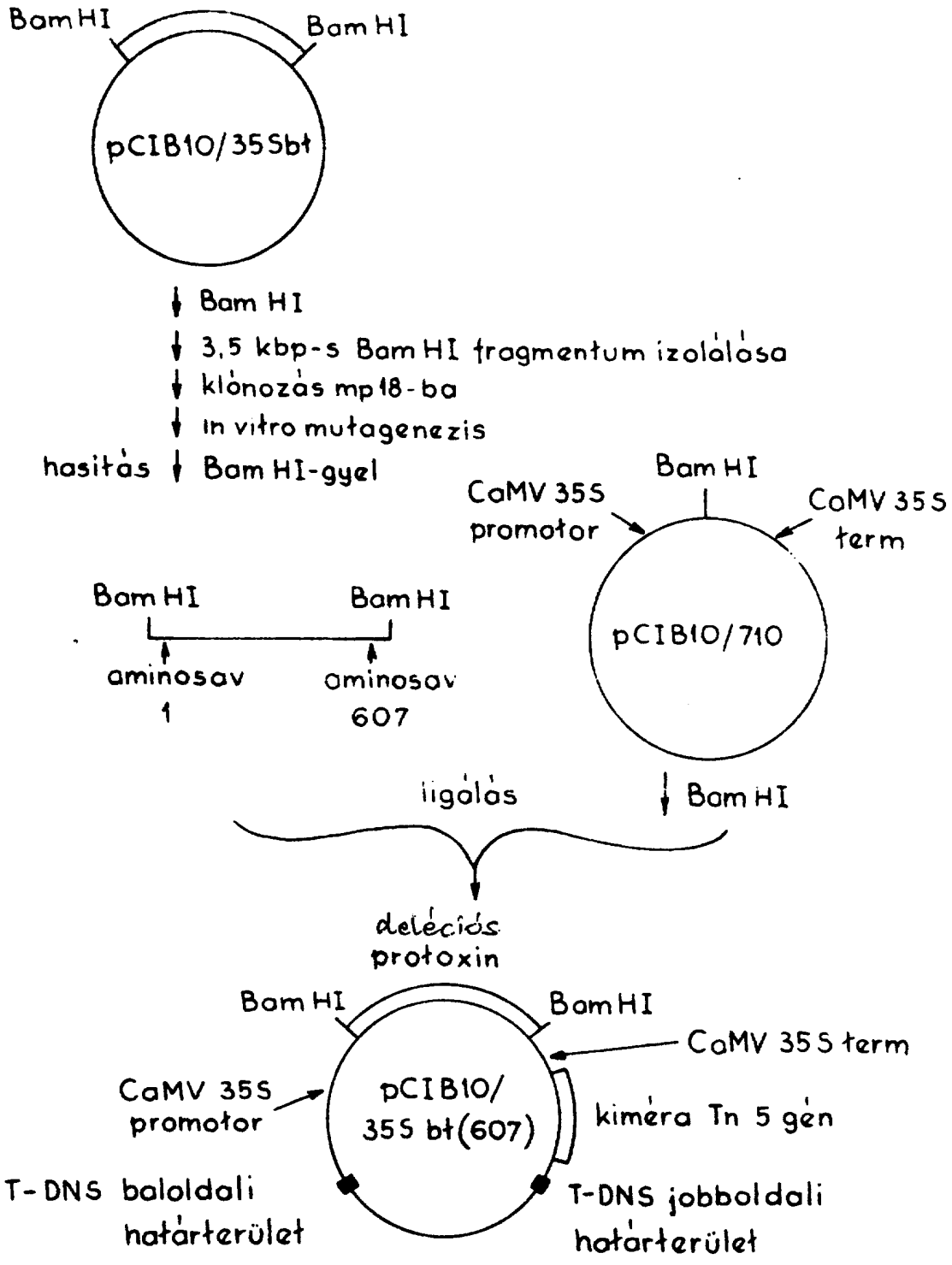
14. ábra


Kpn I
protoxin szek-
vencia
Bam HI
Bam HI
pCIB10/35Sbt
Bam HI
2,2 kbp-s fragmentum izolálása
összekeverés
Bam HI/ KpnI
adapterrel
Bam HI
CaMV 35S
promotor
CaMV 35S
term
pCIB10/710
(KpnI)°
Bam HI
Bam HI
5'
3'
Bam HI
ligálás
deléciós protoxin
szekvencia
(KpnI)°
Bam HI
Bam HI
CaMV 35S term
CaMV 35S promotor
pCIB10/35Sbt
(KpnI)
kiméra Tn 5 gén
T-DNS bololdali
határterület
T-DNS jobboldali
határterület

15. ábra


protoxin szek-
vencia
Bam HI
Bam HI
pCIB10/355bt
Bam HI
CaMV35S
promotor
CaMV 35S
term
pCIB10/710
Bam HI
Bam HI + Bcl I
1.9 kbp-s Bam HI/ Bcl I fragmentum izolálása
ligálás
deléciós
protoxin
Bam HI
(Bcl I/Bam HI)°
CaMV 35S term
CaMV 35S promotor
pCIB10/355bt
(Bcl I)
kiméra Tn 5 gén
T-DNS bololdali
határterület
T-DNS jobboldali
határterület

16. ábra


Bam HI
Bam HI
pCIB10/35Sbt
Bam HI
3,5 kbp-s Bam HI fragmentum izolálása
klónozás mp18-ba
in vitro mutagenezis
hasítás
Bam HI-gyel
Bam HI
CaMV 35S promotor
CaMV 35S term
pCIB10/710
Bam HI
Bam HI
aminosav 1
aminosav 607
ligálás
Bam HI
deléciós protoxin
Bam HI
Bam HI
CaMV 35S term
CaMV 35S promotor
pCIB10/ 35S bt(607)
kiméra Tn 5 gén
T-DNS baloldali határterület
T-DNS jobboldali határterület

17. ábra

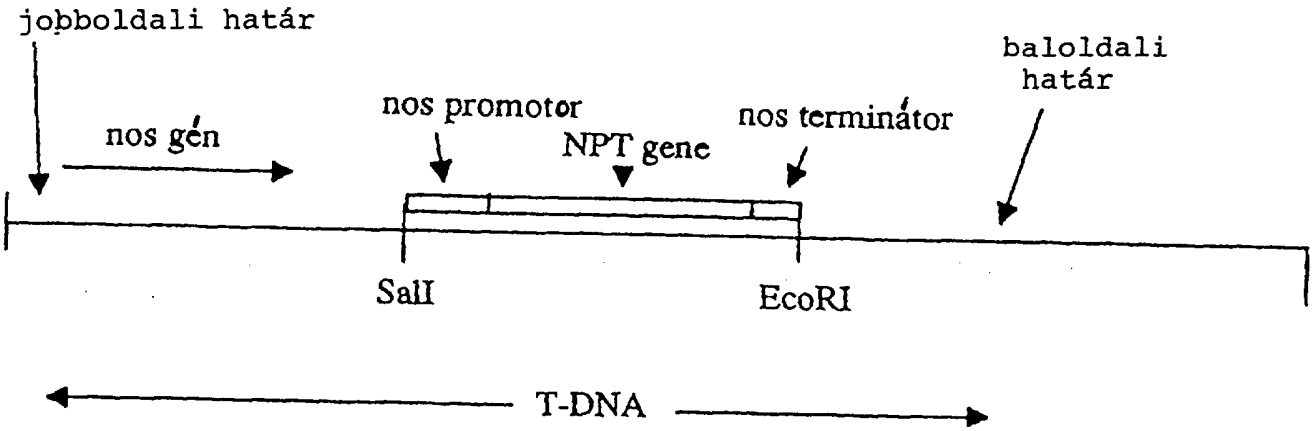
A pLW111 plazmid 1149 BP-s fragmentumának DNS szekvenciája

```
   1  GATCTCCTTT GCCCCAGAGA TCACAATGGA CGACTTCCTC TATCTCTACG ATCTAGTCAG
  61  GAAGTTCGAC GGAGAAGGTG ACGATACCAT GTTCACCACT GATAATGAGA AGATTAGCCT
 121  TTTCAATTTC AGAAAGAATG CTAACCCACA GATGGTTAGA GAGGCTTACG CAGCAGGTCT
 181  CATCAAGACG ATCTACCCGA GCAATAATCT CCAGGAGATC AAATACCTTC CCAAGAAGGT
 241  TAAAGATGCA GTCAAAAGAT TCAGGACTAA CTGCATCAAG AACACAGAGA AAGATATATT
 301  TCTCAAGATC AGAAGTACTA TTCCAGTATG GACGATTCAA GGCTTGCTTC ACAAACCAAG
 361  GCAAGTAATA GAGATTGGAG TCTCTAAAAA GGTAGTTCCC ACTGAATCAA AGGCCATGGA
 421  GTCAAAGATT CAAATAGAGG ACCTAACAGA ACTCGCCGTA AAGACTGGCG AACAGTTCAT
 481  ACAGAGTCTC TTACGACTCA ATGACAAGAA GAAAATCTTC GTCAACATGG TGGAGCACGA
 541  CACGCTTGTC TACTCCAAAA ATATCAAAGA TACAGTCTCA GAAGACCAAA GGGCAATTGA
 601  GACTTTTCAA CAAAGGGTAA TATCCGGAAA CCTCCTCGGA TTCCATTGCC CAGCTATCTG
 661  TCACTTTATT GTGAAGATAG TGGAAAAGGA AGGTGGCTCC TACAAATGCC ATCATTGCGA
 721  TAAAGGAAAG GCCATCGTTG AAGATGCCTC TGCCGACAGT GGTCCCAAAG ATGGACCCCC
 781  ACCCACGAGG AGCATCGTGG AAAAAGAAGA CGTTCCAACC ACGTCTTCAA AGCAAGTGGA
 841  TTGATGTGAT ATCTCCACTG ACGTAAGGGA TGACGCACAA TCCCACTATC CTTCGCAAGA
 901  CCCTTCCTCT ATATAAGGAA GTTCATTTCA TTTGGAGAGG ACACGCTGAA ATCACCAGTC
 961  TCTCTCTACA AATCTATCTC TCTCTATAAT AATGTGTGAG TAGTTCCCAG ATAAGGGAAT
1021  TAGGGTTCTT ATAGGGTTTC GCTCATGTGT TGAGCATATA AGAAACCCTT AGTATGTATT
1081  TGTATTTGTA AAATACTTCT ATCAATAAAA TTTCTAATTC CTAAAACCAA AATCCAGTAC
1141  TAAAATCCA
```

A pLW111 fragmentumból egy BamHI hely bevezetésével előállított 1155 bázispárral rendelkező mutáns DNS szekvenciája (a pCIB710 szerkezete alapján)

```
  1  GATCTCCTTT GCCCCAGAGA TCACAATGGA CGACTTCCTC TATCTCTACG ATCTAGTCAG
        AGGAAA CGGGGTCTCT AGTGTTACCT GCTGAAGGAG ATAGAGATGC TAGATCAGTC

 61  GAAGTTCGAC GGAGAAGGTG ACGATACCAT GTTCACCACT GATAATGAGA AGATTAGCCT
     CTTCAAGCTG CCTCTTCCAC TGCTATGGTA CAAGTGGTGA CTATTACTCT TCTAATCGGA

121  TTTCAATTTC AGAAAGAATG CTAACCCACA GATGGTTAGA GAGGCTTACG CAGCAGGTCT
     AAAGTTAAAG TCTTTCTTAC GATTGGGTGT CTACCAATCT CTCCGAATGC GTCGTCCAGA

181  CATCAAGACG ATCTACCCGA GCAATAATCT CCAGGAGATC AAATACCTTC CCAAGAAGGT
     GTAGTTCTGC TAGATGGGCT CGTTATTAGA GGTCCTCTAG TTTATGGAAG GGTTCTTCCA

241  TAAAGATGCA GTCAAAAGAT TCAGGACTAA CTGCATCAAG AACACAGAGA AAGATATATT
     ATTTCTACGT CAGTTTTCTA AGTCCTGATT GACGTAGTTC TTGTGTCTCT TTCTATATAA

301  TCTCAAGATC AGAAGTACTA TTCCAGTATG GACGATTCAA GGCTTGCTTC ACAAACCAAG
     AGAGTTCTAG TCTTCATGAT AAGGTCATAC CTGCTAAGTT CCGAACGAAG TGTTTGGTTC

361  GCAAGTAATA GAGATTGGAG TCTCTAAAAA GGTAGTTCCC ACTGAATCAA AGGCCATGGA
     CGTTCATTAT CTCTAACCTC AGAGATTTTT CCATCAAGGG TGACTTAGTT TCCGGTACCT

421  GTCAAAGATT CAAATAGAGG ACCTAACAGA ACTCGCCGTA AAGACTGGCG AACAGTTCAT
     CAGTTTCTAA GTTTATCTCC TGGATTGTCT TGAGCGGCAT TTCTGACCGC TTGTCAAGTA

481  ACAGAGTCTC TTACGACTCA ATGACAAGAA GAAAATCTTC GTCAACATGG TGGAGCACGA
     TGTCTCAGAG AATGCTGAGT TACTGTTCTT CTTTTAGAAG CAGTTGTACC ACCTCGTGCT

541  CACGCTTGTC TACTCCAAAA ATATCAAAGA TACAGTCTCA GAAGACCAAA GGGCAATTGA
     GTGCGAACAG ATGAGGTTTT TATAGTTTCT ATGTCAGAGT CTTCTGGTTT CCCGTTAACT

601  GACTTTTCAA CAAAGGGTAA TATCCGGAAA CCTCCTCGGA TTCCATTGCC CAGCTATCTG
     CTGAAAAGTT GTTTCCCATT ATAGGCCTTT GGAGGAGCCT AAGGTAACGG GTCGATAGAC

661  TCACTTTATT GTGAAGATAG TGGAAAAGGA AGGTGGCTCC TACAAATGCC ATCATTGCGA
     AGTGAAATAA CACTTCTATC ACCTTTTCCT TCCACCGAGG ATGTTTACGG TAGTAACGCT

721  TAAAGGAAAG GCCATCGTTG AAGATGCCTC TGCCGACAGT GGTCCCAAAG ATGGACCCCC
     ATTTCCTTTC CGGTAGCAAC TTCTACGGAG ACGGCTGTCA CCAGGGTTTC TACCTGGGGG

781  ACCCACGAGG AGCATCGTGG AAAAAGAAGA CGTTCCAACC ACGTCTTCAA AGCAAGTGGA
     TGGGTGCTCC TCGTAGCACC TTTTTCTTCT GCAAGGTTGG TGCAGAAGTT TCGTTCACCT

841  TTGATGTGAT ATCTCCACTG ACGTAAGGGA TGACGCACAA TCCCACTATC CTTCGCAAGA
     AACTACACTA TAGAGGTGAC TGCATTCCCT ACTGCGTGTT AGGGTGATAG GAAGCGTTCT

901  CCCTTCCTCT ATATAAGGAA GTTCATTTCA TTTGGAGAGG ACACGCTGAA ATCACCAGTC
     GGGAAGGAGA TATATTCCTT CAAGTAAAGT AAACCTCTCC TGTGCGACTT TAGTGGTCAG

961  TCTCTCTACA AATCTATCTC TCTCTATAAG GATCCTAATG TGTGAGTAGT TCCCAGATAA
     AGAGAGATGT TTAGATAGAG AGAGATATTC CTAGGATTAC ACACTCATCA AGGGTCTATT
                                      BamHI hely
```

```
1021  GGGAATTAGG GTTCTTATAG GGTTTCGCTC ATGTGTTGAG CATATAAGAA ACCCTTAGTA
      CCCTTAATCC CAAGAATATC CCAAAGCGAG TACACAACTC GTATATTCTT TGGGAATCAT

1081  TGTATTTGTA TTTGTAAAAT ACTTCTATCA ATAAAATTTC TAATTCCTAA AACCAAAATC
      ACATAAACAT AAACATTTTA TGAAGATAGT TATTTTAAAG ATTAAGGATT TTGGTTTTAG

1141  CAGTACTAAA ATCCA
      GTCATGATTT TAGGTCTAG
```


jobboldali határ
nos gén
nos promotor
NPT gene
nos terminátor
baloldali határ
SalI
EcoRI
T-DNA