HU 000214357 B

(19) Országkód:

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

214 357 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 93 02252
(22) A bejelentés napja: 1992. 02. 24.
(30) Elsőbbségi adatok:
07/659,434 1991. 02. 25. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/GB 92/00331
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/14824

(40) A közzététel napja: 1995. 01. 30.
(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 1998. 03. 30.

(51) Int. Cl.[6]

C 12 N 15/53
C 12 N 15/82
C 12 N 9/02
C 12 N 5/10
A 01 N 63/00
A 01 H 5/00

(72) Feltalálók:
Hartman, Christina L., Princeton, New Jersey (US)
Johal, Sarjit S., Newton, Pennsylvania (US)
Schmitt, Mark R., Trenton, New Jersey (US)

(73) Szabadalmas:
ZENECA Ltd., London (GB)

(74) Képviselő:
Dr. Tóth-Urbán László és dr. Jalsovszky Györgyné, Budapest

(54) Készítmény és eljárás oxálsav lebontására és az oxalátok mennyiségének csökkentésére növényekben, és eljárás növények védelmére oxálsavat kiválasztó gombákkal szemben

(57) KIVONAT

A találmány tárgya készítmény növények védelmére oxálsavat kiválasztó gombák okozta betegségekkel szemben, amely legfeljebb 95 tömeg% oxalát-oxidázt tartalmaz, mezőgazdaságilag alkalmazható hordozóanyagokkal, hígítószerekkel és/vagy egyéb segédanyagokkal együtt. A találmány tárgya továbbá eljárás oxálsav lebontására növényekben oly módon, hogy a növényre vagy a növény környezetébe felviszik a fenti készítményt.

Végül a találmány tárgya eljárás az oxalátok mennyiségének csökkentésére növényi szövetekben, valamint eljárás növények védelmére oxálsavat kiválasztó gombák kártételeivel szemben oly módon, hogy a növény genomjába stabilan beépítenek egy oxalát-oxidáz enzimet kódoló gént.

HU 214 357 B

A találmány tárgya készítmény és eljárás oxálsav lebontására növényekben, és eljárás a növényi szövetekben lévő oxalát mennyiségének csökkentésére. A találmány tárgya továbbá eljárás növények védelmére oxálsavat kiválasztó gombák kártételeivel szemben.

A mezőgazdaság kezdetei óta az emberiség folyamatosan szembekerült a növénybetegségek problémájával. A mezőgazdaság történetében már igen sokféle lépés történt a növénybetegségek leküzdésére; ilyen például a hibridnövények kialakítása, a kártevőirtószerek használata és a mezőgazdasági gyakorlat fejlesztése. Ennek ellenére – amint azt bármely mezőgazdász, hobbikertész vagy szobanövény-rajongó tanúsíthatja – a növénytermesztés állandó kísérő jelensége a növénybetegségek problémája. A találmány révén – amely egyes mikroorganizmusok (köztük elsősorban gombák) növények elleni támadásmódjára vonatkozó régi ismeret kiaknázásán alapul – jelentős haladást érhetünk el a növénybetegségek leküzdésében. Közelebbről, a találmány olyan megoldást szolgáltat, amellyel lelassítható vagy megakadályozható a kórokozó anyag behatolása a növényi szövetekbe, és ezáltal megelőzhető a növénybetegség kialakulása, vagy visszaszorítható a fertőzés növényeket károsító hatása.

Ahhoz, hogy egy növényi kórokozó megfertőzhesse a növényt, a kórokozónak be kell hatolnia a növénybe, majd el kell jutnia a növény minden részébe. A növényi kórokozók ezt többféle úton érik el. A bejutás lehetővé válásának egyik általános módja az, hogy a kórokozók olyan vegyi anyagokat választanak ki, amelyek a megtámadandó növény (a kórokozó szempontjából a gazdanövény) egyes komponenseit és/vagy anyagcsere-folyamatait károsítják. A növénybetegségek kialakulásában szerepet játszó, növényi kórokozók által kiválasztott vegyületek fő csoportjait a toxinok, az enzimek, a poliszacharidok és/vagy a növényi növekedést befolyásoló más faktorok alkotják. Az ilyen vegyületek egyike az oxálsav (az oxalátokat is beleértve), ami oxalát-oxidáz enzimmel bontható el.

Noha az oxalát-oxidáz által katalizált reakció jól ismert, az enzim – így az árpa oxalát-oxidáz – fiziko-kémiai sajátságait a szakirodalomban [Chiriboga J.: Archives of Biochemistry and Biophysics *116,* 516–523 (1966)] helytelenül ismertették (lásd az 1. táblázat adatait is).

Számos növénybetegséget okozó gombanemzetség – köztük a Sclerotinia, Sclerotium, Aspergillus, Streptomyces, Penicillium, Pythium, Paxillus, Mycena, Leucostoma, Rhizoctonia és Schizophyllum nemzetség – közös jellemzője, hogy a kórokozó oxálsav-kiválasztás útján támadja meg a gazdanövényt. A felsorolt nemzetségekbe – elsősorban a Sclerotinia nemzetségbe – tartozó gombakártevők számos nagy mennyiségben termesztett növény (például szántóföldi növények, így napraforgó, szójabab, babfélék általában, repce, lucerna, len, pórsáfrány, földimogyoró és lóhere; zöldségfélék, így fejessaláta, paradicsom, tök, burgonya, sárgarépa, retek, borsó, lencse, káposzta, brokkoli és karfiol; virágok, így petunia és morzsika; fafajták, így őszibarackfa) esetén okoznak roncsoló és végzetes betegségeket. A betegségek nemcsak a földeken a betakarítás előtti időszakban jelennek meg, hanem a betakarítás után is a szállítás és a raktározás során.

A fent felsorolt gombanemzetségek által előidézett betegségek tünetei a gazdanövény jellegétől, a betegséggel fertőzött növényi résztől és a kórokozó támadásának időpontjában fennálló környezeti tényezőktől függően változnak. Például az összes Sclerotinia-betegségre az jellemző, hogy először a levelek elfonnyadnak és kiszáradnak, majd a gomba gyorsan beszűrődik a növény „szívébe" a teljes szár mentén. A betegség végzetes.

Sclerotinia folyékony tenyészeteiben a táptalajtól, a tenyészet korától és más paraméterektől függően 1000 ppm és 10 000 ppm közötti oxálsav-szintet észleltek. Egyes növényi szövetek – így a bab- és napraforgólevelek – már kis oxálsav-szintnek kitéve is a fonnyadás és sejtpusztulás jeleit mutatják, jelezve az oxálsavnak a betegség későbbi stádiumaiban betöltött fontos szerepét. Ma még nem ismert, hogy a gombák által kiválasztott oxálsav milyen pontos mechanizmus szerint vezet a betegség kialakulásához, bár erre többféle elmélet létezik. Egyes elméletek szerint az oxálsav azáltal teszi lehetővé az azt kiválasztó gombák behatolását és így a betegség kialakulását a növényi szervezetben, hogy kelátot képez a növényi sejtfalakkal és/vagy a kulcsfontosságú anyagcsere-enzimekkel kölcsönhatásba lépő kétvegyértékű fémekkel, míg más elméletek szerint az oxálsav optimális mikrokörnyezetet biztosít a gombák által kiválasztott hidrolitikus enzimek működéséhez. Bármi legyen is a pontos mechanizmus, a jelenlegi adatok azt bizonyítják, hogy az oxálsav a kórokozó támadásának alapvető komponense. Ezt a következtetést számos vizsgálat alátámasztotta, többek között az az adat, hogy a hidrolitikus enzimek és más faktorok teljes normális készletével rendelkező, de oxalát-negatív Sclerotinia mutánsok nem idéznek elő betegségtüneteket, míg az oxalát-negatív mutánsok revertánsaival a szokásos módon és tünetekkel fejlődik ki a betegség.

Jól ismert, hogy a fenti nemzetségekbe tartozó gombák nagymértékben virulens betegségeket idéznek elő. Így például a melegházban nevelt, Sclerotinia sclerotorummal megfertőzött napraforgó növények levelein gyakran már 3–5 nappal a megfertőzés után észlelhető fonnyadás és erezetmenti szövetelhalás. Az ilyen növények vizsgálata során a hipokotil (a növényi embrió vagy csíranövény tengelyének a sziklevél alatti része) sérüléseinek vizes extraktumaiban egy fonnyadáskeltő anyag jelenlétét mutatták ki. Kémiai vizsgálatokkal, köztük vékonyréteg-kromatográfiával és gáz-folyadék kromatográfiával igazolták, hogy ez a fonnyadáskeltő anyag oxálsavat tartalmaz, és a fertőzött növényekről származó elfonnyadt levelek oxálsav-tartalma az egészséges növények leveleiben mért érték több mint tizenötszöröse. Miként már közöltük, az oxálsav szisztémásan halad végig a növény szervezetében, és még a fertőzés kiindulási pontjától távol lévő és gombahífákkal nem feltétlenül fertőzött szöveteken is betegségre utaló tüneteket idéz elő.

Egyes növényekben a növény által kialakított természetes termékekként szokásosan fordulnak elő oxalátok.

Ilyen természetes oxalátok halmozódnak fel egyes zöldlevelű zöldségfélékben, például spenótban és rebarbarában, továbbá néhány takarmány-hüvelyesben. Noha ezek a növények a táplálkozás útján bevihető vitaminok és ásványi anyagok jó forrásai, nagy mennyiségben való fogyasztásuk az emberi szervezet számára toxikus, mert kalciumionokat kötnek meg, ami oldhatatlan kalcium-oxalát formájában kiválik a vesében, és ez hiperoxaluriához és a veseszövetek károsodásához vezet.

Ismert az is, hogy az oxálsav más növényi anyagcsere-termékekkel reakcióba lépve erősen toxikus oxalátszármazékokat képezhet. Így képződik például a β-N-oxalil-L-α, β-diamino-propionsav, ami egy neurotoxin.

Egyes növényfajták tehát oxálsav-tartalmuk miatt nem vagy csak igen korlátozottan használhatók fel emberi vagy állati táplálékként.

A fenti háttér alapján elsőként ismertük fel, hogy a betegség kialakulásának kulcsfontosságú tényezőjeként oxálsavat kiválasztó gombák növénykárosító hatása várhatóan jelentősen visszaszorítható lenne, ha lehetővé válna egy oxalát-lebontó enzimet (például oxalát-oxidázt, oxalát-dekarboxilázt vagy más hasonló enzimet) megfelelően azonosítani, elkülöníteni, és a növényekben kifejezni. Elsőként ismertük fel azt is, hogy oxálsav-lebontó enzim növényben való kifejezésével várhatóan csökkenthető azok természetes oxalát-tartalma. Ez különösen a nagy természetes oxalát-tartalmú növények [például földimogyoró, répa, spenót, rebarbara, árpa, kakaó és sok füféle (lásd: Libert és Franceschi: J. Agric. Food Chem. *35,* 926–938 /1987/)] esetén jelentene előnyt, mert jelentősen visszaszorítaná a felhasználásukat korlátozó toxicitást. Célul tűztük ki tehát az erre alkalmas enzim elkülönítését és azonosítását, továbbá olyan gén azonosítását és elkülönítését génsebészeti módszerekkel, amely növényekbe és mikróbákba oxalát-oxidáz aktivitást bevivő fehérje kódolására alkalmas.

Vizsgálataink során olyan enzimet sikerült azonosítanunk és jellemeznünk, amely alkalmas olyan növénybetegségek visszaszorítására, amelyek kialakulásában az oxálsav szerepet játszik. Az általunk azonosított és jellemzett oxalát-oxidáz enzim katalízis vagy más mechanizmus révén közrehat az oxalát szén-dioxid és hidrogén-peroxid termeléséhez vezető oxidatív lebomlásában. A bruttó reakciófolyamat a következő egyenlettel írható le:

$$\text{oxalát} + O_2 \xrightarrow{\text{oxalát-oxidáz}} 2CO_2 + H_2O_2$$

Az enzim azonosítása, elkülönítése és kifejezése mellett munkánk alapvető részét képezte az enzim helyes jellemzése és klónozása is. Ezáltal lehetőségünk nyílt arra, hogy a növénybe oxalát-oxidáz enzimet kifejező gént vigyünk be. Az oxalát-oxidáz enzim növényben való kifejeződésének kettős előnye van: egyrészt az oxálsav lebontása révén védelmet nyújt a növénynek az oxálsavat kiválasztó gombák okozta betegségekkel szemben, másrészt a növény természetes oxalát-tartalmának csökkentése révén szélesíti a növény felhasználhatóságát.

A szakirodalom [Dratewka–Kos és munkatársai: J. Biol. Chem. *264*(9), 4896–4900 (1989)] már beszámolt egy germin nevű fehérjéről, amit búzacsírából különítettek el. A szerzők ismertették a germin fiziko-kémiai jellemzőit, valamint a germint kódoló gén elkülönítését, szekvenálását és szerkezetét. Megállapították, hogy a germin izoformjai az összes gazdaságilag fontos gabonanövényben megjelennek a csírázás során. A szerzők a germinnek és izoformjainak növényfejlődés-marker szerepet tulajdonítottak, más lehetséges hatásról azonban nem tettek említést.

Korábban kitűzött céljaink elérésére az árpa oxalát-oxidáz enzimet vettük vizsgálat alá. Ezt a kereskedelemben is kapható enzimet, amit növényvédelem céljára eddig még nem hasznosítottak, és genetikai kialakításáról sem áll rendelkezésre adat, Chiriboga ismertette korábban idézett közleményében. Az enzim árpa csíranövényből való elkülönítése, tisztítása és vizsgálata alapján – amit a következőkben ismertetünk – megállapítottuk, hogy a közlemény helytelen adatokat tartalmaz az enzim fizikai-kémiai jellemzőire, ami vélhetően arra vezethető vissza, hogy a szerzőnek nem sikerült az enzimet megfelelően elkülönítenie és tisztítania.

Az enzim elkülönítésére és tisztítására a következő két módszert használtuk:

Az egyik módszer szerint a fagyasztott szöveteket 1–4 térfogatrész vízzel homogenizáltuk, és a homogenizátumból szűrővásznon kiszűrtük a sejttörmeléket. A kapott oldatot továbbtisztításra 30 percig 18 000 g gyorsuláson centrifugáltuk, majd 3 percig 80 °C-on hőkezeltük. Mindkét lépésben eltávolítottuk a kapott csapadékot. A felülúszóhoz ammónium-szulfátot adtunk, a 30%-os és 70%-os ammónium-szulfát telítettség között kivált fehérjét centrifugálással elkülönítettük, és vízzel szemben dializáltuk. Az így elkülönített fehérjét újraoldás után 25 mmólos kálium-acetát pufferoldattal (pH 4,8) egyensúlyba hozott Mono S 10/10 Pharmacia FPLC oszlopon kromatografáltuk, eluálószerként 0,0 mól és 0,04 mól között grádiens-szerűen növekvő nátrium-klorid tartalmú 25 mmólos kálium-acetát oldatot használtunk. Az eluátumfrakciók oxalát-oxidáz aktivitását Sugiura és munkatársai módszerével [Chem. Pharm. Bull. *27*(9), 2003 (1979)] mértük. A csúcsaktivitást mutató frakciókat egyesítettük, és a fenti kis sótartalmú kálium-acetát pufferoldattal (pH 4,8) egyensúlyba hozva Mono S 5/5 Pharmacia FPLC oszlopon újra kromatografáltuk. Eluálószerként a fenti grádiens szerint növekvő mennyiségű nátrium-kloridot tartalmazó pufferoldatot használtunk. Az oszlopot elhagyó eluátumfrakciók oxalát-oxidáz aktivitását mértük, a csúcsaktivitást mutató frakciókat egyesítettük, és 25 mmólos Trisz-HCl pufferoldattal (pH 7,6) egyensúlyba hozva Mono Q 5/5 oszlopra vittük fel. Az oszlopot a fenti grádiens szerint növekvő mennyiségű nátrium-kloridot tartalmazó pufferoldattal eluáltuk, az eluátumfrakciók oxalát-oxidáz aktivitását mértük, és a csúcsaktivitást mutató frakciókat nátrium-dodecil-szulfát/poli(akril-amid) gél elektroforézisnek (SDS-PAGE) vetettük alá. Az elektroforetogramon ezüstfestéssel kb. 25 kilodalton és 38–40 kilodalton molekulatömegnél erős fehérje-sávokat észleltünk.

A natív fehérje ezt követő méretfrakcionálása során [amihez 50 mmolos kálium-acetát pufferoldattal

(pH 4,8) egyensúlyba hozott Superose-12 FPLC gélszűrő oszlopot használtunk] már csak egy jól meghatározott, a kb. 25 000-es móltömeghez tartozó időpontban leoldódó aktív frakciót kaptunk. Oxalát-oxidáz aktivitás a más molekulatömegekhez tartozó időpontokban leoldódó frakciók egyikében sem volt kimutatható.

A másik elkülönítési és tisztítási módszerben detergenssel való extrakciót használtunk. 4–7 napos árpa csíranövények gyökereit folyékony nitrogén jelenlétében elporítottuk, és –80 °C-on tároltuk. Ilyen tárolási körülmények között az aktivitás nem csökken észrevehető mértékben. A tárolt szöveteket 0,5% nátrium-tauro-dezoxikolátot tartalmazó desztillált vízzel homogenizáltuk, majd a homogenizátumot szűrtük, és a szűrletet centrifugáltuk. A felülúszót és az üledéket oxalát-oxidáz aktivitásra vizsgálva kimutattuk, hogy mindkét frakció rendelkezik oxalát-oxidáz aktivitással. Ezért az üledéket 0,5% nátrium-tauro-dezoxikolátot tartalmazó desztillált vízzel újra extraháltuk. Desztillált vízzel szembeni kimerítő dialízis után az oldható anyagot tartalmazó felülúszó mintáihoz a fehérje koncentrálása és frakcionálása céljából ammónium-szulfátot adtunk. Az ammónium-szulfátra nézve 30–70%-osan telített frakciókból kivált fehérjéket egyesítettük, detergenst tartalmazó kevés desztillált vízben szuszpendáltuk, és kisméretű Sephadex G25 gélpermeációs oszlopon sómentesítettük. Az oxalát-oxidáz aktivitást mutató frakciót ezután Trisz-HCl pufferoldatban (pH 7,5) oldva DEAE anioncserélő oszlopra vittük fel, és a megkötött fehérjét grádiens-szerűen növekvő mennyiségű nátrium-kloridot tartalmazó pufferoldattal eluáltuk. Az oxalát-oxidáz aktivitást mutató eluátumfrakciót betöményítettük, sómentesítettük, majd Mono-Q oszlopra (Pharmacia gyártmány) vittük fel. A fehérjéket ismét nátrium-klorid gradiens fenntartásával eluáltuk. Az aktivitásvizsgálatok eredményei szerint az oxalát-oxidáz három frakcióban dúsult fel. Ezeket a frakciókat SDS-PAGE elemzésnek alávetve megállapítottuk, hogy az oxalát-oxidáz aktivitást egy kb. 25 kilodalton molekulatömegű polipeptid hordozza.

A fentiek szerinti tisztítás után meghatároztuk a kapott tisztított, homogén oxalát-oxidáz preparátum fiziko-kémiai jellemzőit és aminosav-összetételét. A kapott eredményeket az 1. és 2. táblázatban közöljük. Összehasonlítás céljából az oxalát-oxidázra a szakirodalomban [Chiriboga: Arch. Biochem. Biophys. *116,* 516–523 (1966)] ismertetett adatokat is feltüntetjük.

1. táblázat
Az oxalát-oxidáz jellemzői

Jellemző	Irodalmi adat	Általunk meghatározott
Optimális pH	3,5	3,5
Hőstabilitás	+	+
Alegységek száma	2	1
Méret	75 kilodalton	25 kilodalton
pI	2,8	kb. 7
Kofaktorok	-	-
Stabilitás proteázokkal szemben	nem ismert	+
Membránhoz kötődés	nem tisztázott	+

2. táblázat

Aminosav	Általunk meghatározott	Irodalmi adat
Asx	12,53	8,44
Ser	8,65	6,50
Gly	13,31	10,75
Glx	7,42	6,80
Thr	9,10	5,18
Ala	7,93	7,85
Val	8,41	6,40
Met	2,85	0
Tyr	0,98	0,93
Ile	2,15	6,39
Leu	9,36	-
Phe	6,89	-
His	1,79	1,68
Lys	5,98	4,90
Trp	-	-
Arg	3,65	3,48

Az oxalát-oxidáz aminosav-összetétele

Az 1. és 2. táblázatban közölt adatokból látható, hogy az általunk elkülönített és tisztított oxalát-oxidáz jellemzői lényegesen eltérnek a szakirodalomban közöltektől. A leírásban és az igénypontokban – amennyiben a szövegkörnyezetben kifejezetten másra nem utalunk – az „oxalát-oxidáz" megjelölésen az általunk meghatározott jellemzőkkel rendelkező, lényegében teljesen tiszta enzimet értjük, amelynek teljes aminosav-szerkezetét a 2. ábrán mutatjuk be. Meglepetéssel tapasztaltuk, hogy az oxalát-oxidáz aminosav-szekvenciája 96%-ban homológ a Dratewka–Kos és munkatársai által korábban ismertetett germin aminosav-szekvenciájával [J. Biol. Chem. *264* (9), 4896–4900 (1989)]; az eltérő aminosavak közül kettő minősül konzervatív szubsztitúciónak. Ez a felismerésünk azért különösen meglepő, mert a korábbi közlemény szerzői a germint csak a növényfejlődés markerjének tekintették, és nem tulajdonítottak a germinnek semmiféle funkciót.

Az oxalát-oxidáz tiszta állapotban való elkülönítése, és szerkezetének és jellemzőinek helyes meghatározása révén az oxalát-oxidáz új alkalmazásaira nyílt lehetőségünk. A találmány tárgyát ezek az új alkalmazások képezik. A találmány értelmében a növényeknek külső forrásból származó vagy magukban a növényekben kifejezett oxalát-oxidázzal biztosítunk védelmet az oxálsavat kiválasztó gombák okozta betegségekkel szemben. A növényekben kifejezett oxalát-oxidázzal a növények természetes oxalát-tartalmát is csökkenthetjük.

A találmány tárgya tehát egyrészről készítmény növények védelmére oxálsavat kiválasztó gombák okozta betegségekkel szemben. A találmány szerinti készítmény oxalát-oxidázt tartalmaz legfeljebb 95 tömeg% mennyiségben, mezőgazdaságilag alkalmazható hordozóanyagokkal, hígítószerekkel és/vagy egyéb segédanyagokkal együtt.

A találmány tárgya továbbá eljárás oxálsav lebontására növényekben oly módon, hogy a növényre vagy a növény környezetébe oxalát-oxidáz enzimet viszünk fel mezőgazdaságilag alkalmazható hordozóanyagokkal, hígítószerekkel és/vagy egyéb segédanyagokkal együtt.

Ezekben az esetekben az oxalát-oxidáz enzimet a klasszikus peszticidekhez hasonlóan használjuk. Az oxalát-oxidáz peszticidkénti használatának fontos előnye, hogy az enzim ökológiailag nem ártalmas, nem szennyezi a környezetet, és nem károsítja a növényt.

Az oxalát-oxidázt a szokásos ismert módszerekkel, folyékony készítmények (például oldatok vagy szuszpenziók) vagy szilárd készítmények (például porozószerek) formájában vihetjük fel a kezelendő területre. A felvitel pontos módja az adott kórokozók és a védendő növények fajtájától függően változhat. A felvitel általános módszereit és azoknak egyedi haszonnövényekre és kórokozókra való adaptálását például K. D. Hicky (szerk.): „Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens" c. szakkönyve (kiadó: The American Phytopathological Society, 1986) részletesen ismerteti. A mezőgazdasági készítmények kialakításához felhasználható hordozóanyagok, hígítószerek és egyéb segédanyagok (például szolubilizálószerek, nedvesítőszerek, stabilizátorok és mikrokapszulás termék képzéséhez szükséges anyagok) szakember számára jól ismertek.

Megjegyezzük, hogy oxalát-oxidáz külső felvitelére rekombináns mikroorganizmusokat is felhasználhatunk akár életképes formában, akár az enzimet nem inaktiváló módon elölt állapotban.

A találmány tárgya továbbá eljárás az oxalátok mennyiségének csökkentésére növényi szövetekben oly módon, hogy a növény genomjába – például genetikai transzformációval – stabilan egy oxalát-oxidáz enzimet kódoló gént építünk be. Az erre a transzformációra alkalmas génszerkezet például promotor szekvenciát, tranzit peptidet, az oxalát-oxidáz enzimet kódoló struktúrgén szekvenciát és génterminátor szekvenciát tartalmazhat.

A találmány tárgya továbbá eljárás növények védelmére oxálsavat kiválasztó gombákkal való megfertőződéssel szemben oly módon, hogy a növény genomjába transzformációval stabilan egy oxalát-oxidáz enzimet kódoló gént építünk be.

A találmány szerinti eljárás általánosan alkalmazható az oxálsavat kiválasztó gombafajták (így a Sclerotinia, Sclerotium, Aspergillus, Streptomyces, Penicillium, Pythium, Paxillus, Mycena, Leucostoma, Rhizoctonia és Schizophyllum nemzetségbe tartozó gombák) kártételei ellen való védekezésre. Különösen előnyösen alkalmazhatjuk a találmány szerinti eljárást Sclerotinia sclerotorum kártételei ellen való védekezésre; ez a gomba többek között napraforgón okoz súlyos károsodásokat, majd teljes pusztulást.

Az árpa-eredetű oxalát-oxidáz enzimet kódoló gén szerkezetét az 1. ábrán, klónozását a 4. ábrán mutatjuk be.

A klónozáshoz szükséges, oxalát-oxidázra specifikus antitesteket a következőképpen alakítottuk ki:

Kereskedelemben beszerezhető, részlegesen tisztított árpa eredetű oxalát-oxidázt (Sigma) szolubilizáltunk, majd 25 mmólos kálium-acetát pufferoldattal (pH 4,8) egyensúlyba hozott Mono S kationcserélő oszlopra vittük fel. Az oszlopot 0 és 400 mmól között grádiens-szerűen növekvő mennyiségű nátrium-kloridot tartalmazó 25 mmólos kálium-acetát pufferoldattal eluáltuk. Az eluátumfrakciókból elkülönített, enzimatikusan aktív fehérjét preparatív SDS-PAGE-sel tovább tisztítottuk. A gélen egyetlen, körülbelül 25 kilodalton molekulatömegnek megfelelő fehérjesáv jelent meg (ez azonos volt az általunk azonosított oxalát-oxidázzal), amit kivágtunk a gélből. A nedves gélszeleteket fragmentáltuk, Freund-adjuvánssal elkevertük, és intramuszkuláris injekcióként nyulak hátsó combizmába adtuk be a csípőhöz közel. Az antigén/antitest reakció megerősítésére az állatoknak további fehérjeadagokat adtuk be, és az állatokból vett vérmintákat oxalát-oxidázra specifikus antitestek termelődésére vizsgáltuk. Mintegy 4 hónap elteltével az állatokat kivéreztettük. A poliklónos nyúl-antitestek igen nagy titerrel termelődtek.

A klónozáshoz árpagyökérből kialakított cDNS könyvtárt használtunk. Árpagyökérből előállítottuk a teljes RNS-t, majd a teljes RNS-ből elkülönítettük a poliadenilezett RNS-t, és ezt használtuk fel a cDNS szintéziséhez. Mind a teljes, mind a poliadenilezett RNS előállításához kereskedelemben kapható RNS-extraháló és mRNS-tisztító vegyszerkészletet (gyártja: Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) használtunk a gyártó utasításai szerint. A Clontech Laboratory által kereskedelmi forgalmazásra szerkesztett könyvtárt használtuk. A könyvtárhoz vektorként λgt22-t választottunk. Ezt a kifejező vektort az oxalát-oxidáz antiszérum nagy titere és specificitása alapján választottuk ki. Bármi legyen is a felhasználásra kiválasztott vektor, előnyös, ha a vektor lehetővé teszi az oxalát-oxidáz cDNS klónok fehérjetermékeinek immunológiai szűrését. Annak alapján, hogy a cDNS könyvtár inszertjeinek átlagos mérete 1,8 kilobázis, és a független klónok nagy számából ($1,7\times10^6$) arra következtettünk, hogy a könyvtárnak tartalmaznia kell egy kb. 25 kilodalton méretű oxalát-oxidáz fehérjének megfelelő cDNS klónt.

A könyvtár kezdeti szűrését oxalát-oxidáz antiszérummal végeztük, standard műveletek szerint [lásd például: Hunyh T. és munkatársai: DNA Cloning Techniques: A Practical Approach (szerk.: D. Glover, kiadó: IRL Press, Oxford, 1985)]. Miután információt szereztünk az érett oxalát-oxidáz fehérje N-terminális aminosav-szekvenciájáról (az N-terminális maradék kivételével), az N-terminális szekvenciát a kezdeti immunológiai szűrésben pozitívnak bizonyult összes cDNS klón azonosítására is felhasználtuk. A cDNS könyvtárból $1,2\times10^6$ plakkot szűrtünk az antiszérummal. 14 potenciálisan pozitív klónt találtunk, amelyek közül egy jóval erősebb volt a többinél. Ezt a 14 klónt egymás után kétszer újra szűrtük annak érdekében, hogy igazoltan pozitív egyedi plakkokat különítsünk el molekuláris szintű azonosítás és jellemzés céljára. Ezekben a további szűrésekben ismét a 12-es számú plakk bizonyult a legpozitívabbnak. Ezt a 12-es számú plakkot használtuk utóbb az oxalát-oxidázra specifikus antitest tisztításához annak ellenőrzésére, hogy a plakk pozitivitása megfelelően specifikus-e. Az antitest tisztítását szokásos mó-

don (például a fent idézett Hunyh-szakkönyvben leírtak szerint) végeztük. A 12-es plakkból tisztított antitestet szondaként használtuk fel az oxalát-oxidáz fehérje akrilamid-gélen végzett Western blot vizsgálatában. A plakkból tisztított antitest specifikusan reagált az oxalát-oxidázzal, és a szondaként tisztított antitestet alkalmazó vizsgálatban kapottal azonos eredményt adott.

A 12-es plakkból származó inszertet (a λgt22 vektorba klónozott cDNS termék) standard polimeráz láncreakciós (PCR) módszerrel nyertük vissza [a módszert többek között Ausubel F. M. és munkatársai (szerk.) „Current Protocols in Molecular Biology" c. munkájának „The Polymerase Chain Reaction" c. fejezete ismerteti a 15. 0. 1–15. 4. 6. oldalon (kiadó: Greene Publishing Associates és Wiley Interscience, New York, 1988]. A 12-es plakkban lévő inszert becsült mérete 650–750 bázispár volt, ami egy kb. 25 kilodalton molekulatömegű fehérjének felelt meg. A cDNS inszert kezdeti méretbecslése és az antitest plakkból való tisztításának eredménye alapján a 12-es plakkot tekintettük a legalkalmasabbnak a további molekuláris analízisre. Ezután a PCR-val előállított 12-es számú inszertet újra klónoztuk egy analízisre alkalmasabb plazmid vektorba. A 12-es klónból származó cDNS inszertet szondaként is felhasználtuk árpagyökér RNS Northern blot vizsgálatában abból a célból, hogy megbecsüljük az oxalát-oxidáz mRNS méretét. Formaldehid-gélelektroforézis és Schleicher és Schuell gyártmányú nylon-membránra való átvitel után (a műveleteket a gyártó által a termékhez mellékelt útmutató szerint végeztük) megállapítottuk, hogy ez a szonda egy egyedi, kb. 800–850 bázispár hosszúságú mRNS-hez hibridizált.

A 12-es plakk újraklónozott inszertjén didezoxi-nukleotid szekvenálást hajtottunk végre. Ehhez kereskedelmi forgalomban lévő T7 szekvenáló készletet (gyártja: Pharmacia LKB Biotechnology Inc.) használtunk a gyártó által javasolt módszer szerint. Megállapítottuk, hogy ez az árpa-eredetű cDNS inszert kb. 690 bázis hosszúságú; a meghatározásban csak két rövid, egyenként legfeljebb 10 bázispárból álló szakasz, a C-terminus és a három N-terminális bázis jellege tekintetében volt némi bizonytalanság. A 12-es klón inszertjének nukleotid-szekvenciáját vázlatosan az 1. ábrán mutatjuk be.

Ezután a 12-es klón nukleotid-szekvenciája alapján megjósoltuk a részleges fehérje-szekvenciát, és ezt egybevetettük a tisztított oxalát-oxidázból közvetlenül meghatározott N-terminális aminosav-szekvenciával. Az egybevetést a 2. ábra szemlélteti. Az érett oxalát-oxidáz enzimet kódoló szekvenciát tartalmazó gént, amelynek szerkezetét az 1. ábra szemlélteti, olyan genetikai szabályozóelemekhez kell kapcsolni, amelyek szükségesek ahhoz, hogy a struktúrgén kifejeződjön egy meghatározott gazdasejtben. A szükséges szabályozóelemek első típusa egy olyan gén-promotor régió, amely a növényi sejt biológiai szerkezete által felismerhető DNS szekvenciákat tartalmazza, és amely a DNS szekvencia hírvivő RNS-be (mRNS) való átírását indukálja. Erről az mRNS-ről olvasható le azután a struktúrgén régió által kódolt fehérje. A promotort az oxalát-oxidáz génje elé, vagy annak 5'-végéhez illeszthetjük a szakirodalomból jól ismert módszerekkel [lásd például T. Maniatis és munkatársai: „Molecular Cloning" 104–106. oldal (kiadó: Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982)]. Az oxalát-oxidáz gén növényi sejtekben történő kifejezéséhez használható promotor régiók egyik jellemző csoportját azok a promotorok alkotják, amelyek különböző növényi szövetek széles választékában aktívak. Ilyen például a karfiol-mozaik vírusból származó 35S promotor, ami az adott célra jól használható. A növényi sejtekben használható promotorok másik jellemző csoportját azok a promotorok alkotják, amelyek csak szorosabban megszabott körülmények között alkalmasak expresszióhoz. Ilyenek például a csak egyes meghatározott növényi szövet(ek)ben aktív promotorok és/vagy azok a promotorok, amelyek csak bizonyos ingerekkel (például megsebzéssel) bírhatók aktivitásra. Az ilyen típusú promotorok egyik képviselője a fenilalanin-ammónia-liáz (PAL) génjének 5'-regulációs régiója [lásd: Liang X. és munkatársai: Proc. Nat. Acad. Sci. USA *8,* 9284–9288 (1989)]. Az oxalát-oxidáz gén mikrobiális gazdaszervezetekben való kifejeződését mikrobiális eredetű promotorokkal is elősegíthetjük. Ilyen promotor például a trp promotor baktériumokban, így E. coliban való kifejeződéshez [lásd Amann E. és munkatársai: Gene *25,* 167–178 (1982)] és a glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz (GAPD) promotor élesztőben való kifejeződéshez [lásd: Edens L. és munkatársai: „Synthesis and Processing of the Plant Protein Thaumatin in Yeast", Cell *37,* 629–633 (1984)]. A génpromotor szekvenciák részben vagy egészben a gazdasejttől eltérő sejtekben található promotor szekvenciákból is származhatnak, feltéve, hogy megfelelnek az átírás és leolvasás fent megadott követelményeinek.

A második genetikai szabályozóelem, amit ugyan nem feltétlenül szükséges, de célszerű az oxalát-oxidáz génhez illeszteni, egy terminátor vagy poliadenilező szekvencia, amely elősegíti a gén átírásának pontos leállítását, és amely eukarióta szervezetekben a poliadenileződést (tetszőleges számú adenozin nukleotid kapcsolódása az mRNS 3'-végéhez) is elősegíti. A terminátor régiót a szakirodalomból jól ismert módszerekkel kapcsolhatjuk a gén mögé vagy a gén 3'-végéhez [lásd például T. Maniatis és munkatársai fent idézett szakkönyvének 104–106. oldalát]. A növényekben történő expresszióhoz felhasználható ilyen terminátor/poliadenilező szekvencia például az Agrobacterium tumefaciens Ti plazmid eredetű oktopin-szintetáz génből származó szekvencia [lásd: H. DeGreve és munkatársai: „Nucleotide Sequence and Transcript Map of the Agrobacterium tumefaciens Ti Plasmid-Encoded Octopine Synthase Gene", J. Mol. Appl. Genet. *1,* 499–511 (1982)]. A mikrobiális gazdaszervezetekben történő expresszióhoz felhasználható terminátor szekvenciák közül példaként a Salmonella typhimuriumból származó rho-független transzkripció terminátor szekvencia [lásd például M. E. Winkler: „Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology", megjelent az American Society for Microbiology 1987. évi kiadványában (főszerk.: F. C. Neidhardt)]. A gén-terminátor szekvenciák részben vagy egészben a gazdasejt-

től eltérő sejtekben található terminátor szekvenciákból is származhatnak mindaddig, amíg megfelelnek azoknak az átírás leállítására és poliadenileződésre vonatkozó fent említett követelményeknek, amelyeket a gazdasejt megkíván.

Az oxalát-oxidáz génjéhez illeszthető további szabályozóelem lehet egy szignálpeptidet kódoló DNS-szekvencia. A szignálpeptid a fehérje amino-terminusához kapcsolódik, és lehetővé teszi, hogy a fehérje a sejtfalhoz lokalizálódjon, vagy kiválasztódjon a gazdasejtből. A lokalizációs folyamat során a szignálpeptid lehasad, és az érett fehérje szekvenciájával rendelkező fehérje-termék képződik. A szignálpeptidet kódoló DNS-szekvenciát a promotor régió és a kódoló régió közé illeszthetjük be, a szakirodalomban ismertetett módszerekkel [lásd például T. Maniatis és munkatársai fent idézett szakkönyvének 104–106. oldalát]. Ilyen szignál-szekvenciák például a következők: egy növényi extenziós génből származó szignálpeptid [Chen J. és Varner J. E.: „An Extracellular Matrix Protein in Plants: Characterization of a Genomic Clone for Carrot Extension", EMBO J. *4,* 2145–2151 (1985)], az Erwinia carotovora bakteriális pelB (pektát-liáz) génjéből származó szignálpeptid [Lei S. P. és munkatársai: J. Bacteriol. *169,* 4379 (1987)], és az élesztő prepro faktorából származó szignálpeptid [Schmidt R. A. és munkatársai: Science *229,* 1219–1229 (1985)]. A szignálpeptid-szekvenciák részben vagy egészben a gazdasejttől eltérő sejtekben található szignálpeptid-szekvenciákból is származhatnak mindaddig, amíg megfelelnek azoknak a fent ismertetett fehérje-lokalizációs és fehérje-átalakulási követelményeknek, amelyeket a gazdasejt megkíván.

Az oxalát-oxidáz gént az idegen gének növényekbe való bejuttatására alkalmas, ismert módszerek bármelyikével beépíthetjük a gazdanövénybe. Az oxalát-oxidáz génnel való növénytranszformálás pontos módszerét a gazdanövénytől függően választjuk meg. Így például a közismert, Agrobacterium-közvetítésű transzformálási eljárást jól alkalmazhatjuk növények oxalát-oxidáz génnel való transzformálására.

Az oxalát-oxidáz gént felhasználó, Agrobacterium-közvetített transzformálás során a szakirodalomban részletesen leírt módszereket követjük [lásd például: Horsch és munkatársai: „A Simple and General Method for Transferring Genes Into Plants", Science *227,* 1229–1231 (1985)]. Először egy legyengített Agrobacterium tumefaciens törzsbe, mint közbülső gazdaszervezetbe beépítjük a növényekben történő expresszióra alkalmas génkazettát. Az oxalát-oxidáz génkazettát egy szelektálható markergént (például neomicin-foszfotranszferáz II-t kódoló gént, foszfinotricin-acetil-transzferázt kódoló gént vagy hasonlót) tartalmazó rekombináns plazmid T-DNS régiójába építjük be. Az így transzformált baktériumokat 2–3 napig növényi szövetdarabokkal (például levél-, sziklevél vagy hipokotil-darabokkal) együtt inkubáljuk, majd a baktériumokat antibiotikummal, például karbenicillinnel elöljük. A növényi szövetek tenyésztőközegéhez a szelektálható markergénnek megfelelő további antibiotikumo(ka)t is adunk, így csak a transzformált növényi sejtek fognak növekedni.

Ezután a transzformált sejtekből regenerált növényeket az oxalát-oxidáz gén jelenlétére és a kifejeződés megtörténtére vizsgáljuk. Az egyedi transzformánsokat immunvizsgálatokkal és oxalát-oxidáz aktivitásvizsgálattal [Sugiura és munkatársai: Chem. Pharm. Bull. *27,* 2003–2007 (1979)] azonosíthatjuk. Funkcionális tesztelésként azt is vizsgálhatjuk, hogy az ép szövetek mennyire képesek a külső forrásból származó oxálsavat tolerálni.

Miként már közöltük, az Agrobacterium-közvetítésű transzformáláson kívül számos más ismert növénytranszformálási módszert is alkalmazhatunk az oxalát-oxidáz gén gazdanövénybe való bevitelére. A DNS-bevitel más módszerei közé tartozik például az elektroporáció (azaz kémiailag indukált bevitel protoplasztokba), a mikroinjektálás és a biolosztika. Egyes növények, így a szója és bizonyos gabonafélék, köztük a kukorica Agrobacterium-közvetítésű transzformálásra nem elég alkalmasak. Nyilvánvaló, hogy az ilyen növények transzformálására az Agrobacterium-közvetítésű módszertől eltérő eljárást célszerű használni.

A találmányt a következőkben példák alapján ismertetjük részletesebben. A leírás eddigi részeiben említett, és a példákban hivatkozott rajzok a következők:

Az 1. ábra az árpa csíranövény oxalát-oxidázát kódoló mRNS-ből reverz technikával származtatott cDNS-szekvenciát mutatja be.

A 2. ábra az 1. ábrán bemutatott cDNS-ről leolvasott aminosav-szekvenciát szemlélteti.

A 3. ábra az 1. és 2. példában az oxalát-oxidáz gén klónozására részletesen ismertetett eljárást szemlélteti diagram formájában .

A 4. ábra a 3. és 4. példában ismertetett klónozási eljárást szemlélteti diagram formájában.

Az 5. ábra a pVB1 plazmid szerkezetét mutatja be.

A 6. ábra a pBin19Ri plazmid szerkezetét szemlélteti

1. példa

Nem-szekretálódó oxalát-oxidáz vektor kialakítása paradicsom transzformálásához

(a) Teljes hosszúságú oxalát-oxidáz rekonstrukciója nyílt leolvasási keretben (ORF):

A 1219901A és a 1219901A-komplementer oligonukleotidot tervezés szerint szintetizáltuk oly módon, hogy az 5'-végen egy HindIII helyet és a 3'-végen egy BsaI helyet hordozó linkert alkossanak.

A 1219901A oligonukleotid a következő volt:

5'-AGCTTGATGGGTACCTCGGACCCAGACCCACTCCAGGACTTCTGCGTCGCGGACCT

CGATGGCAAGGCGGTCTCG-3'

A 1219901A-komplementer oligonukleotid a következő volt:

5'-TCACCGAGACCGCCTTGCCATCGAGGTCCGCGACGCAGAAGTCCTGGAGTGGGTCTG

GGTCCGAGGTACCCATCA-3'

Az oligonukleotidokat összekapcsoltuk, és HindIII-mal hasított és BsaI-el részlegesen hasított 22-es klónba klónoztuk. Így létrehoztuk a pOXOXl klónt, ami – miként peptid-szekvenciálással igazoltuk – az érett oxalát-oxidáz nyílt leolvasási keretét tartalmazta.

A HindIII/BsaI-gyel hasított linker 22-es klónba való klónozása után az érett oxalát-oxidáz ORF sértetlenségét DNS-szekvenálással igazoltuk.

(b) Az oxalát-oxidáz ORF beépítése egy expressziós vektorba:

Az érett oxalát-oxidázt kódoló régiót agarózból izoláltuk 700 bázispárból álló HindIII/BamHI fragmensként, és a végeket T_4 DNS polimerázzal tompává tettük. A pNB33A vektort XbaI-gyel és PstI-gyel hasítottuk, a vektor-fragmenst agarózból izoláltuk, és a végeket T_4 polimerázzal tompává tettük.

Ezt a két tompavégű fragmenst összekapcsolva létrehoztuk a pNBOXOXl klónt . Az oxalát-oxidázt kódoló régió helyes elhelyezkedését a pNBOXOXl klónban DNS szekvenálással igazoltuk.

(c) Az oxalát-oxidáz kifejező kazetta beépítése pBinl9Ri plazmidba:

A pNBOXOXl klónt HindIII-mal hasítottuk és EcoRI-gyel részlegesen hasítottuk. Az 1,9 kilobázis méretű kifejező kazettát agarózból izoláltuk, és EcoRI-gyel és HindIII-mal hasított pBinl9Ri plazmidba (lásd a 6. ábrát) klónoztuk. A pNOXl klónt kaptuk.

Az oxalát-oxidáz kifejező kazetta jelenlétét a pNOXl klónban a plazmid DNS EcoRI és HindIII restrikciós enzimmel való hasításával igazoltuk.

2. példa

Nem-szekretálódó oxalát-oxidáz vektor kialakítása napraforgó transzformálásához

(a) Az oxalát-oxidáz kifejező kazetta bevitele pVBl plazmidba:

A 2,1 kilobázis méretű EcoRI/HindIII fragmenst, amely a pNBOXOX1-ből elkülönített oxalát-oxidáz kifejező kazettát tartalmazza (lásd az 1. példát), EcoRI-gyel és HindIII-mal hasított pVBl plazmidba (lásd az 5. ábrát) klónoztuk. Így a pVBOXl klónt kaptuk.

Az oxalát-oxidáz kifejező kazetta jelenlétét a pVBOXl klónban a plazmid DNS EcoRI és HindIII restrikciós enzimmel való hasításával igazoltuk.

(b) Higromicin rezisztencia-gén beépítése a pVBOXl klónba:

pl9HYG-ból (higromicin rezisztencia-gént tartalmazó ismert plazmid) elkülönítettünk egy 2,3 kilobázis méretű HindIII fragmenst, ami a higromicin rezisztencia kazettát tartalmazza. Ezt a fragmenst HindIII-mal hasított pVBOXl-be klónoztuk. Így a pHOXl klónt kaptuk.

A higromicin rezisztencia kazetta jelenlétét és elhelyezkedését a pHOXl klónban a plazmid DNS EcoRI-gyel való emésztése útján igazoltuk.

3. példa

Szekretálódó oxalát-oxidáz vektor kialakítása paradicsom transzformálásához

(a) Külső tranzit peptid/oxalát-oxidáz fúziós termék előállítása PCR technikával:

Az érett oxalát-oxidáz/külső tranzit peptid fúziós termék kialakításához a következő szekvenciájú EXTOX-5 és EXTOX-3 oligonukleotidokat terveztük és szintetizáltuk:

EXTOX-5: 5'-TTCAACTGGTACCATTTGTTTCAAAGATGGGAAAAATGCTTCTCTAT

TTGCCACATTTTTAGTGGTTTTAGTGTCACTTAGCTTAGCTTCTGAAACCGACCAGACCC

ACTCCAGGACTTC-3'

EXTOX-3: 5'-CTATTAAATTCGCGGTACTGGATATATAGAATTAC-3'

A PCR reakcióban a fenti oligomereket használtuk primerekként, templátként pNBOXl klónt használtunk. A kapott, 771 bázispárból álló EXTOX PCR terméket, ami egy 23 aminosavból álló külső tranzit peptidet tartalmazott az érett oxalát-oxidázt kódoló tartományhoz keretben fuzionált formában, KpnI-gyel hasítottuk.

(b) Az EXTOX PCR termék beillesztése pJR1 (pUC) plazmidba:

A fent ismertetett, KpnI-gyel hasított EXTOX PCR terméket KpnI-gyel hasított pJRl (pUC) plazmidba klónoztuk. Így a pJEXTOXl klónt kaptuk. Az EXTOX PCR termék szekvenciáját és helyzetét a pJEXTOXl klónban DNS szekvenálással igazoltuk.

(c) Az EXTOX kifejező kazetta beépítése pBinl9Ri plazmidba:

A pJEXTOXl klónból 1,5 kilobázis méretű EcoRI/HindIII fragmensként elkülönítettük a tranzit peptid/oxalát-oxidáz kifejező kazettát, és ezt EcoRI-gyel és HindIII-mal hasított pBinl9Ri plazmidba klónoztuk. A pNEXTOXl klónt kaptuk.

A kifejező kazetta jelenlétét a pNEXTOXl klónban a plazmid DNS EcoRI-gyel és HindIII-mal való emésztésével igazoltuk.

4. példa

Szekretálódó oxalát-oxidáz vektor kialakítása napraforgó transzformálásához

(a) A szekretálódó kifejező kazetta elkülönítése és beépítése pVBl plazmidba:

A tranzit peptid/oxalát-oxidáz kifejező kazettát 1,5 kilobázis méretű EcoRI/HindIII fragmensként különítettük el a pJEXTOXl klónból (lásd a 3. példát), és EcoRI-gyel és HindIII-mal hasított pVBl plazmidba klónoztuk. Így a pVEXTOXl klónt kaptuk.

A kifejező kazetta jelenlétét a pVEXTOXl klónban a plazmid DNS EcoRI-gyel és HindIII-mal való emésztésével igazoltuk.

(b) Higromicin rezisztencia-gén beépítése a pVEXTOXl klónba:

pl9HYG-ból elkülönítettünk egy 2,3 kilobázis méretű HindIII fragmenst, ami a higromicin rezisztencia kazettát tartalmazza. Ezt a fragmenst HindIII-mal hasított pVEXTOXl klónba klónoztuk. Így a pHEXTOXl klónt kaptuk. A higromicin rezisztencia kazetta jelenlétét és elhelyezkedését a pHEXTOXl klónban a plazmid DNS EcoRI-gyel való emésztése útján igazoltuk.

5. példa

Transzgén olajrepce-növények előállítása és vizsgálata

Teljes hosszúságú (710 bázispárból álló) oxalát-oxidáz klónt Nicotiana plumbaginifolia-ból származó sejtfal-célzó szekvenciához (tranzit peptid, ami a fehérjét a sejten kívüli térbe irányítja, ahol a toxin kiválasztódik) kapcsoltunk, majd karfiol-mozaik vírus 35S promotorral együtt egy biner Agrobacterium vektorba (pBinl9) illesztettük be. Az így kapott plazmidot – ami a 3. példában említett pJEXTOXl klónnak felelt meg – használtuk fel a transzgén növények kialakításához. A növényeket Moloney M. M. és munkatársai módszerével [„High Efficiency Transformation of Brassica napus Using Agrobacterium Vectors", Plant Cell Reports *8,* 238–242 (1989)] transzformáltuk, közbülső gazdaszervezetként Agrobacter tumefaciens LBA4404 törzset, növényi szövetként olajrepce (Brassica napus) sziklevél-nyeleket használtunk. A növényi szövetek tenyésztőközegéhez 15 mg/l kanamicin antibiotikumot adtunk annak érdekében, hogy csak a transzformált növényi sejtek növekedjenek.

Az elkülönített transzformált olajrepce-sejtekből gyökeres növénykéket regeneráltunk, és a növénykéket standard PCR reakcióval és Southern analízissel az oxalát-oxidáz szerkezet jelenlétére vizsgáltuk. Az igazoltan transzformálódott növénykék levél- és gyökérszövet-extraktumait ezután Western analízissel vizsgáltuk oxalát-oxidáz jelenlétére. Az enzim kimutatására a korábbiakban ismertetett módon kialakított, a 25 kilodalton méretű oxalát-oxidáz monomerre specifikus poliklónális antitestet használtuk. A PCR és Southern vizsgálatban pozitívnak bizonyult összes növény Western foltdiagramján a 25 kilodaltonnak megfelelő molekulaméretnél erősen hibridizáló sáv jelent meg, ami az oxalát-oxidáz jelenlétét igazolta. A kontroll szövetminták Western foltdiagramján a 25 kilodaltonnál kisebb molekulaméretnél tartozó tartományban néhány halvány sáv jelent meg, és a 25 kilodaltonnak megfelelő molekulaméretnél nem észleltünk erős sávot. A transzformált növények szövet-extraktumait Sugiura és munkatársai módszerével [Chem. Pharm. Bull. *27,* 2003–2007 (1979)] oxalát-oxidáz aktivitásra vizsgáltuk. A vizsgált extraktumok oxalát-oxidáz aktivitása 2–47 nmól H_2O_2 fejlődése/perc/mg fehérje volt, ami egyértelműen igazolta, hogy a növényekben hatásos oxalátbontó enzim fejeződött ki. A kontroll növények szövetextraktumai nem mutattak oxalát-oxidáz aktivitást.

A további vizsgálatokba azokat a növényi leszármazási ágat vontuk be, amelyeket abból a három szülőnövényből fejlesztettünk ki, amelyekben a Western analízis alapján a legnagyobb mértékben fejeződött ki az oxalát-oxidáz. Ezt a három növényi leszármazási ágat rendre OxOxl-gyel, OxOx2-vel és OxOx3-mal jelöljük.

Az oxalát-tűrőképesség laboratóriumi gyorsvizsgálata során a fenti három ágból származó transzgén növények és kontrollnövények leveleit nyelüknél fogva 4-es pH-jú vizes oxálsav oldatba helyeztük, és időről időre vizuálisan vizsgáltuk a levelek fonnyadását. A kontrollnövények levelei 4 óra alatt mind elfonnyadtak, míg a transzgén növények levelein 24 óra elteltével sem észleltünk fonnyadást.

A fenti három ágból származó növényeket Jealott's Hill-i kísérleti telepünkön (Bracknell, Berkshire, Nagy-Britannia) üvegházi körülmények között több generáción át termesztve homozigótás utódokat hoztunk létre. A nagyparcellás kísérletekhez ezeknek az utódnövényeknek a magvait használtuk fel.

A nagyparcellás kísérletek során a növények magvait olyan talajba vetettük, amiről tudtuk, hogy előző évben Sclerotinia-val erősen meg volt fertőzve. Minden egyes vizsgálatot két-két parcellán végeztük el. Minden parcellában 2×6, azaz 12 sorba vetettük a növények magvait úgy, hogy a kettős sorokba vetett transzgén növény-magvak mellett jobbról és balról elhelyezkedő sorokba vetettük a kontrollnövények magvait. Az egyedi parcellákon ezután 6-6 alparcellát jelöltünk ki; így mindegyik előre tervezett értékelési időponthoz 1-1 alparcella tartozott. Az egyes alparcellákban 6-6 sorban soronként 15 növény helyezkedett el úgy, hogy a négy középső sorban transzgén növények, a két szélső sorban kontrollnövények növekedtek. Az utóbbi sorokban növekedő növények belső kontrollként szolgáltak az egyes alparcellákon végzett értékelésekhez. A rovarkártételek visszaszorítására és a környezet nedvességének növelésére a parcellákat fóliasátorral fedtük.

Az egyes értékelési napokon a fóliasátor elejétől a vége felé haladva egy-egy alparcelláról betakarítottuk a növényeket (a sarokhatás kivédésére 2-2 növényt a parcellában hagytunk), és a növényeket levélkárosodásra és/vagy szárkárosodásra vizsgáltuk. Az első értékelési napon csak az egy növényre jutó levélkárosodások számát határoztuk meg annak érdekében, hogy megbecsüljük az inokulum-nyomást a barázda mentén. Az ezt

követő értékelési napokon a szárkárosodást és a laterális károsodásokat értékeltük. A vizsgálat időtartama alatt észleltük, hogy a transzgén növények és a kontrollnövények életerőssége eltér egymástól. Ezért a növényeket méret szerint csoportosítottuk, és a kis-, közepes és nagyméretű növényeken külön-külön végeztük el az értékelést és az összehasonlítást. Az egyes méretcsoportokban az utolsó értékelési napon észlelt károsodások számértékeit a 3. táblázatban foglaljuk össze.

3. táblázat

Transzgén (T) és kontroll (K) növényeken észlelt károsodás

	Kisméretű		Közepes méretű		Nagyméretű	
	T	K	T	K	T	K
OxOx1	0,26	0,3	0,09	0,25	0,06	0,23
OxOx2	0,06	0,33	0,24	0,49	0,07	0,55
OxOx3	0,22	0,25	0,19	0,36	0,1	0,52

A 3. táblázat adataiból megállapítható, hogy a genetikailag módosított növények a kontrolloknál ellenállóbbak a betegséggel szemben. Az ellenállóképességben a közepes méretű és a nagyméretű növények esetén szignifikáns eltérés tapasztalható.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Készítmény növények védelmére oxálsavat kiválasztó gombák okozta betegségekkel szemben, *azzal jellemezve,* hogy legfeljebb 95 tömeg% oxalát-oxidázt tartalmaz, mezőgazdaságilag alkalmazható hordozóanyagokkal, hígítószerekkel és/vagy egyéb segédanyagokkal együtt.

2. Eljárás oxálsav lebontására növényekben, *azzal jellemezve,* hogy a növényre vagy a növény környezetébe oxalát-oxidáz enzimet viszünk fel mezőgazdaságilag alkalmazható hordozóanyagokkal, hígítószerekkel és/vagy egyéb segédanyagokkal együtt.

3. Eljárás az oxalátok mennyiségének csökkentésére növényi szövetekben, *azzal jellemezve,* hogy a növény genomjába stabilan beépítünk egy oxalát-oxidáz enzimet kódoló gént.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a gént genetikai transzformációval építjük be a növénybe.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a növény genomját egy promotor szekvenciát, tranzit peptidet, az oxalát-oxidáz enzimet kódoló struktúrgén szekvenciát és génterminátor szekvenciát tartalmazó génszerkezettel transzformáljuk.

6. Eljárás növények védelmére oxálsavat kiválasztó gombákkal való megfertőződéssel szemben, *azzal jellemezve,* hogy a növények genomjába transzformációval stabilan beépítünk egy oxalát-oxidázt kódoló gént.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a növényt Sclerotinia, Sclerotium, Aspergillus, Streptomyces, Penicillium, Pythium, Paxillus, Mycena, Leucostoma, Rhizoctonia és/vagy Schizophyllum nemzetségbeli, oxálsavat kiválasztó gombákkal szemben védjük.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy a növényt Sclerotinia sclerotorummal szemben védjük.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve,* hogy növényként napraforgót (Helianthus annuus) használunk.

Szekv. ID NO: 1

Szekvencia típus: Nukleotid

Szekvencia hossza: 702 bp

DNS fonálszerkezet: egyszálu

Topológia: Lineáris

Molekula típus: DNS

Az eredeti forrás organizmus: Árpa

Közvetlen kisérleti forrás: pGEM11Zf/+/ klón # 22

Jellemzők:

1-603: oxalát-oxidázt kódoló régió

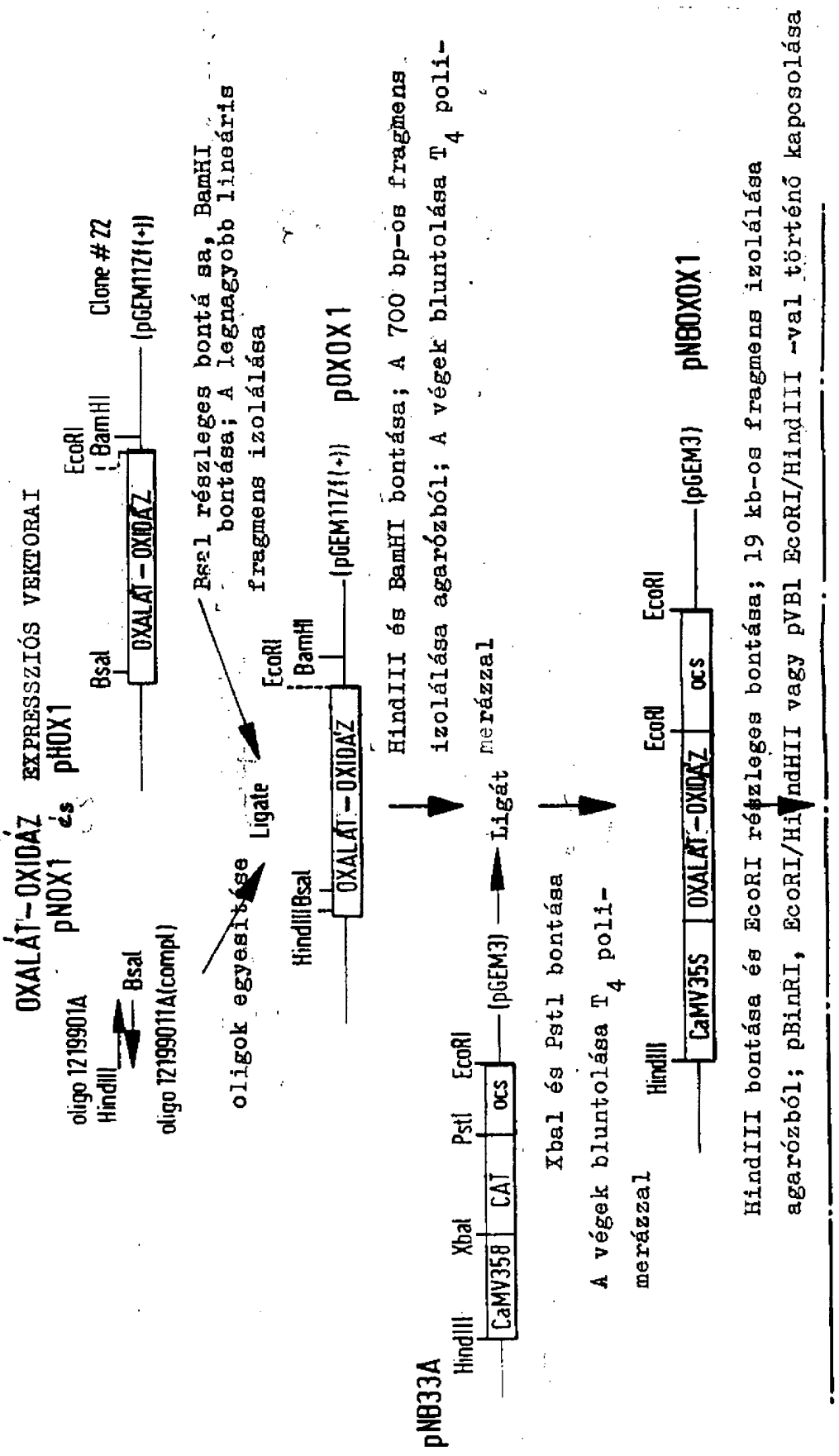
Meghatározó: A cDNS oxalát-oxidázt kódoló fragmense

```
GACCCAGACC CACTCCAGGA CTTCTGCGTC GCGGACCTCG ATGGCAAGGC GGTCTCGGTG  60
AACGGGCATA CGTGTAAGCC CATGTCGGAG GCCGGCGACG ACTTCCTCTT CTCGTCCAAG 120
CTGACCAAGG CCGGCAACAC GTCCACCCCG AACGGCTCGG CCGTGACGGA GCTCGACGTG 180
GCCGAGTGGC CCGGTACGAA CACGCTGGGC GTGTCCATGA ACCGTGTGGA CTTCGCGCCG 240
GGGGGCACCA ACCCGCCGCA CATCCACCCG CGTGCAACCG AGATCGGCAT GGTGATGAAA 300
GGTGAGCTCC TCGTTGGAAT CCTCGGCAGC CTTGACTCCG GAAACAAGCT CTACTCCAGG 360
GTGGTGCGTG CCGGACAGAC TTTCGTCATC CCGCGCGGCC TCATGCACTT CCAGTTCAAC 420
GTTGGTAAGA CGGAAGCCTA CATGGTTGTG TCCTTCAACA GCCAGAACCC TGGCATCGTC 480
TTCGTGCCGC TCACACTCTT CGGCTCCGAC CCTCCCATCC CCACGCCCGT GCTCACCAAG 540
GCTCTCCGGG TGGAGGCCGG AGTCGTGGAA CTTCTCAAGT CCAAGTTCGC CGGTGGGTCT 600
TAACTTCCAT GAGCCCCAAA TGATCAATAT GAATATGTAA TTCTATATAT CCATGTATGC 660
TGCGAATTTA ATAGTACTCG ACAGGAGACT ATACCGGAAT TC                      702
```

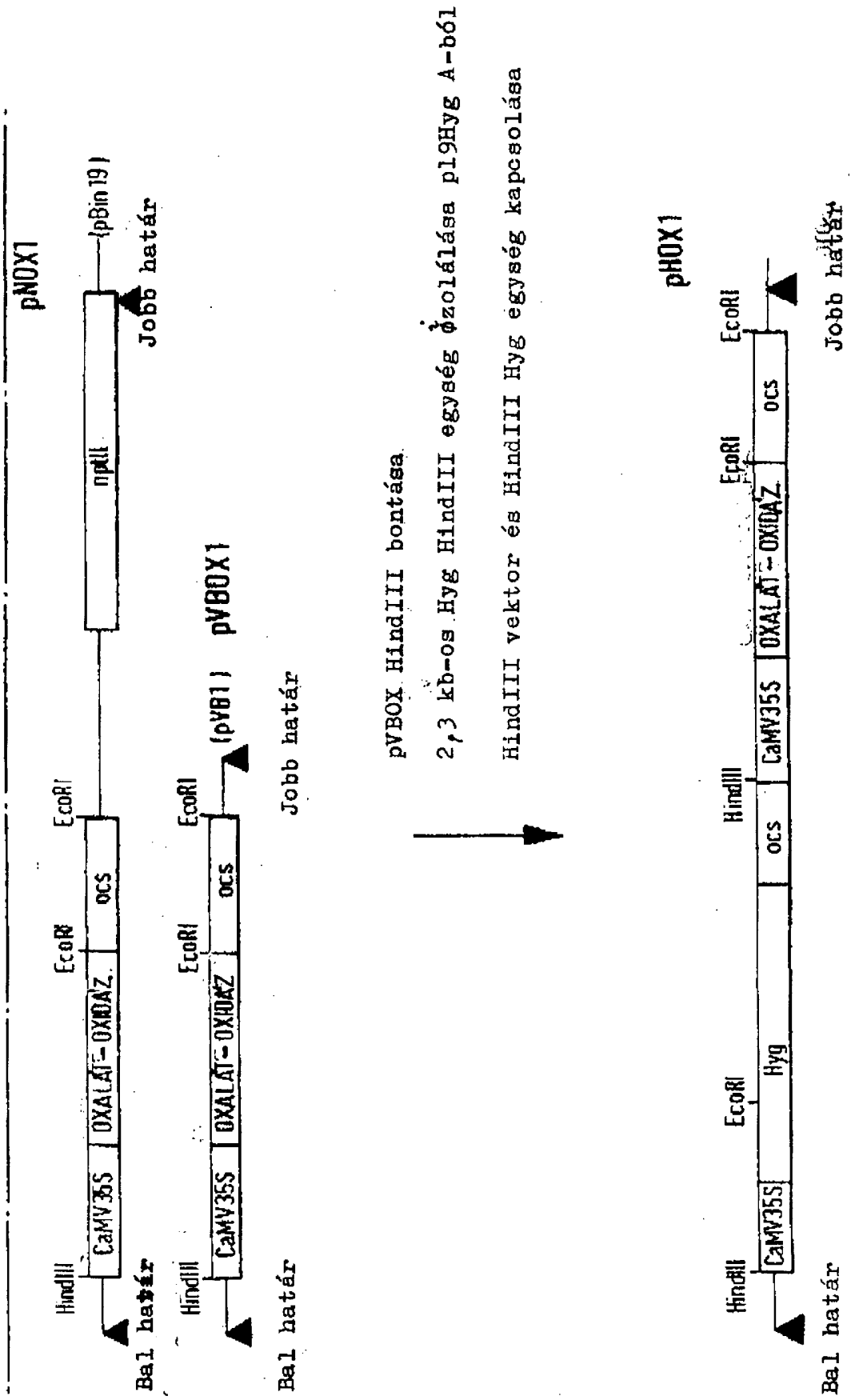
1. ábra

Az ID NO: 1 szekvencia transzlációja

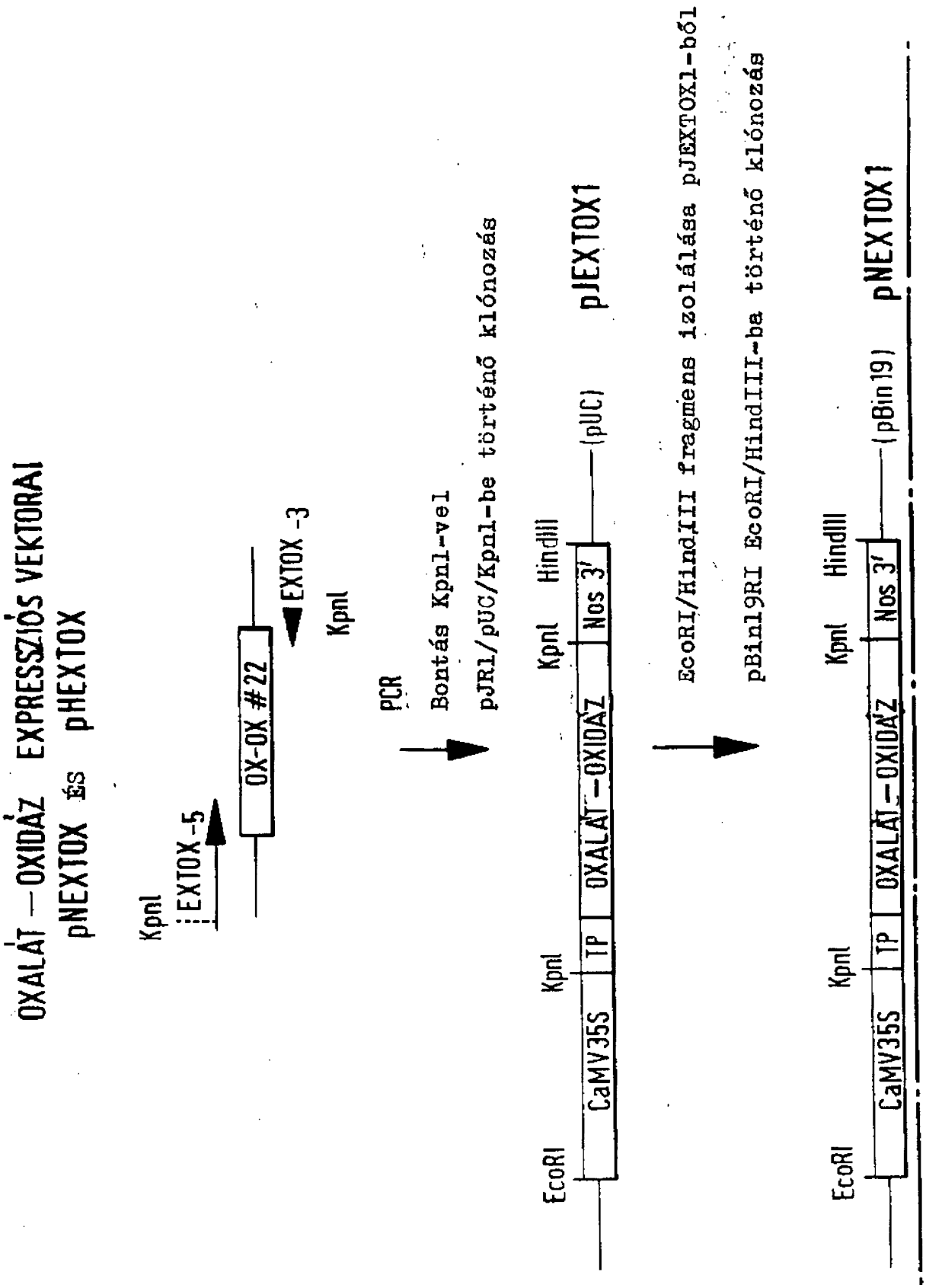
```
                                                                  30
                                                                  --
                                                                  E
                                                                  V
                                                                  P
                                                                  R
                                                                  V
                                                                  K
                                                                  T
                                                                  S
                                                                  V
                                                                  L
                                                                  M
                                                                  Y
                                                                  S
                                                                  H
                                                                  I
                                                                  L
                                                                  P
                                                                  V
                                                                  A
                                                                  E
                                                                  Y
                                                                  K
                                                                  N
                                                                  P
                                                                  P
                                                                  T
                                                                  V
                                                                  K
                                                                  S
                                                                  T
                                                                  E
                                                                  E
                                                                  N
                                                                  G
                                                                  S
                                                                  K
                                                                  T
                                                                  P
                                                                  P
                                                                  I
                                                                  G
                                                                  D
                                                                  S
                                                                  L
                                                                  G
                                                                  V
                                                                  N
                                                                  P
                                                                  P
                                                                  S
                                                                  G
                                                                  S
                                                                  F
                                                                  N
                                                                  S
                                                                  D
                                                                  S
                                                                  G
                                                                  Q
                                                                  F
                                                                  L
                                                                  I
                                                                  D
                                                                  F
                                                                  E
                                                                  A
                                                                  G
                                                                  L
                                                                  F
                                                                  A
                                                                  S
                                                                  T
                                                                  N
                                                                  V
                                                                  D
                                                                  G
                                                                  K
                                                                  A
                                                                  V
                                                                  S
                                                                  A
                                                                  G
                                                                  N
                                                                  R
                                                                  V
                                                                  L
                                                                  M
                                                                  H
                                                                  T
                                                                  L
                                                                  S
                                                                  K
                                                                  A
                                                                  G
                                                                  N
                                                                  L
                                                                  L
                                                                  L
                                                                  G
                                                                  D
                                                                  L
                                                                  K
                                                                  M
                                                                  S
                                                                  L
                                                                  G
                                                                  E
                                                                  R
                                                                  V
                                                                  P
                                                                  L
                                                                  K
                                                                  T
                                                                  D
                                                                  L
                                                                  G
                                                                  V
                                                                  G
                                                                  P
                                                                  R
                                                                  G
                                                                  L
                                                                  E
                                                                  L
                                                                  A
                                                                  K
                                                                  S
                                                                  L
                                                                  G
                                                                  K
                                                                  I
                                                                  V
                                                                  E
                                                                  L
                                                                  V
                                                                  S
                                                                  S
                                                                  L
                                                                  M
                                                                  V
                                                                  I
                                                                  V
                                                                  V
                                                                  F
                                                                  S
                                                                  S
                                                                  T
                                                                  F
                                                                  T
                                                                  F
                                                                  G
                                                                  I
                                                                  V
                                                                  C
                                                                  L
                                                                  T
                                                                  N
                                                                  M
                                                                  V
                                                                  K
                                                                  E
                                                                  T
                                                                  P
                                                                  N
                                                                  Q
                                                                  V
                                                                  F
                                                                  D
                                                                  L
                                                                  F
                                                                  G
                                                                  T
                                                                  G
                                                                  E
                                                                  I
                                                                  G
                                                                  A
                                                                  Q
                                                                  E
                                                                  L
                                                                  P
                                                                  D
                                                                  D
                                                                  P
                                                                  A
                                                                  S
                                                                  S
                                                                  V
                                                                  E
                                                                  A
                                                                  G
                                                                  L
                                                                  P
                                                                  D
                                                                  W
                                                                  E
                                                                  A
                                                                  G
                                                                  D
                                                                  D
                                                                  P
                                                                  R
                                                                  T
                                                                  E
                                                                  A
                                                                  L
                                                                  V
                                                                  R
                                                                  A
                                                                  V
                                                                  F
                                                                  N
                                                                  S
                                                                  L
                                                                  R
                                                                  V
                                                                  S
                                                                  S
                                                                  R
                                                                  A
                                                                  L
                                                                  K
                                                                  V
                                                                  E
                                                                  E
                                                                  K
                                                                  V
                                                                  L
                                                                  T
                                                                  V
                                                                  V
                                                                  K
                                                                  L
                                                                  T
                                                                  L
                                                                  L
                                                                  T
                                                                  L
                                                                  L
                                                                  L
```


OXALÁT-OXIDÁZ EXPRESSZIÓS VEKTORAI
pNOX1 és pHOX1
oligo 12199011A
HindIII
BsaI
oligo 12199011A(compl)
BsaI
OXALÁT-OXIDÁZ
EcoRI
BamHI
Clone #22
(pGEM11Zf(+))
oligok egyesítése
Ligate
BsaI részleges bontása, BamHI bontása; A legnagyobb lineáris fragmens izolálása
EcoRI
BamHI
HindIII
BsaI
OXALÁT-OXIDÁZ
(pGEM11Zf(+))
pOXOX1
HindIII és BamHI bontása; A 700 bp-os fragmens izolálása agarózból; A végek bluntolása T4 polimerázzal
Ligát
pNB33A
HindIII
XbaI
CaMV35S
CAT
PstI
EcoRI
ocs
(pGEM3)
XbaI és PstI bontása
A végek bluntolása T4 polimerázzal
HindIII
EcoRI
CaMV35S
OXALÁT-OXIDÁZ
ocs
(pGEM3)
pNBOXOX1
HindIII bontása és EcoRI részleges bontása; 19 kb-os fragmens izolálása agarózból; pBinRI, EcoRI/HindIII vagy pVBl EcoRI/HindIII -val történő kapcsolása

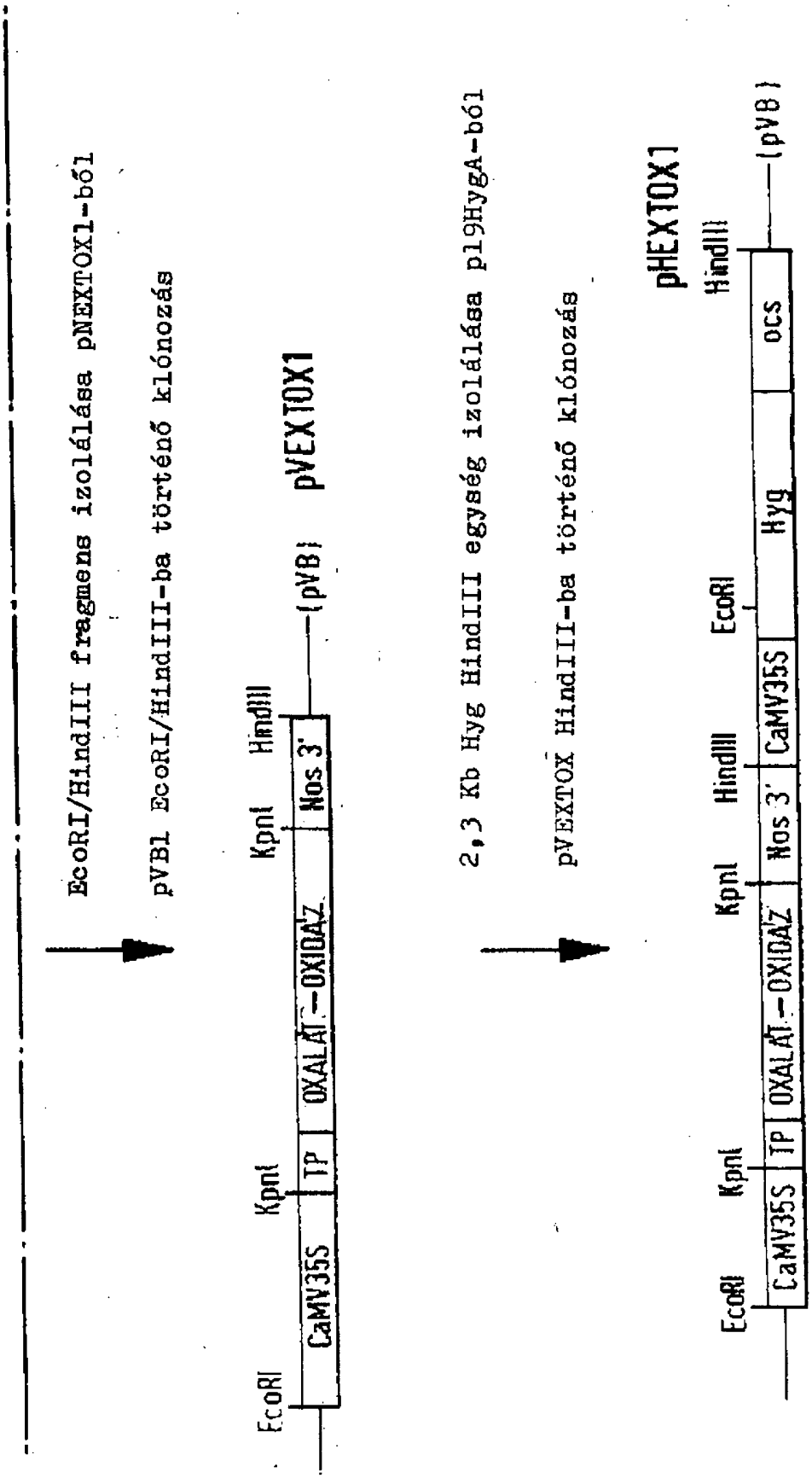
3. ábra



3. ábra folytatása

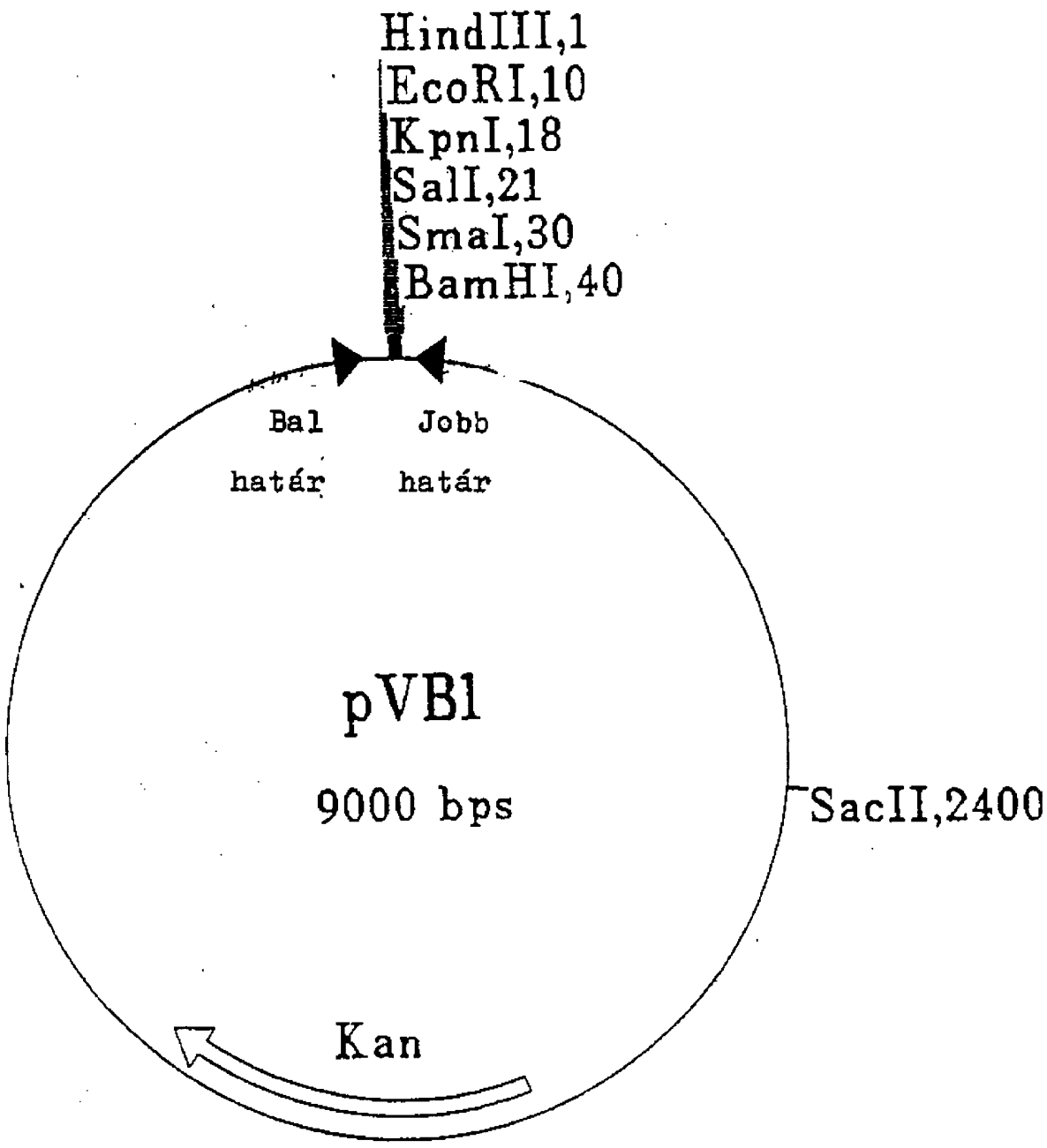

OXALÁT—OXIDÁZ EXPRESSZIÓS VEKTORAI
pNEXTOX és pHEXTOX
KpnI
EXTOX-5
OX-OX #22
EXTOX -3
KpnI
PCR
Bontás KpnI-vel
pJR1/pUC/KpnI-be történő klónozás
KpnI
HindIII
EcoRI
CaMV35S
TP
OXALÁT—OXIDÁZ
Nos 3'
(pUC)
pJEXTOX1
EcoRI/HindIII fragmens izolálása pJEXTOX1-ből
pBin19RI EcoRI/HindIII-ba történő klónozás
KpnI
HindIII
EcoRI
CaMV35S
TP
OXALÁT—OXIDÁZ
Nos 3'
(pBin19)
pNEXTOX1

4. ábra



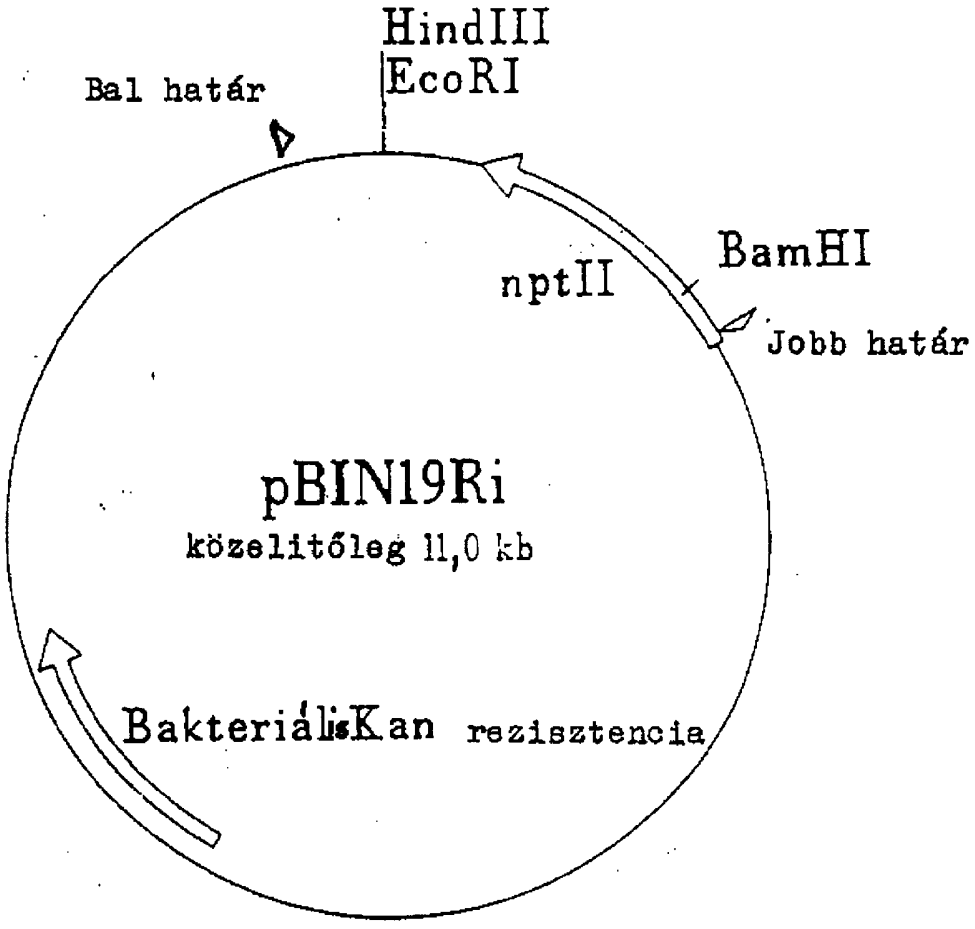
4. ábra folytatása

pVB1 = plazmid szerkezete



5. ábra

pBIN19Ri szerkezete

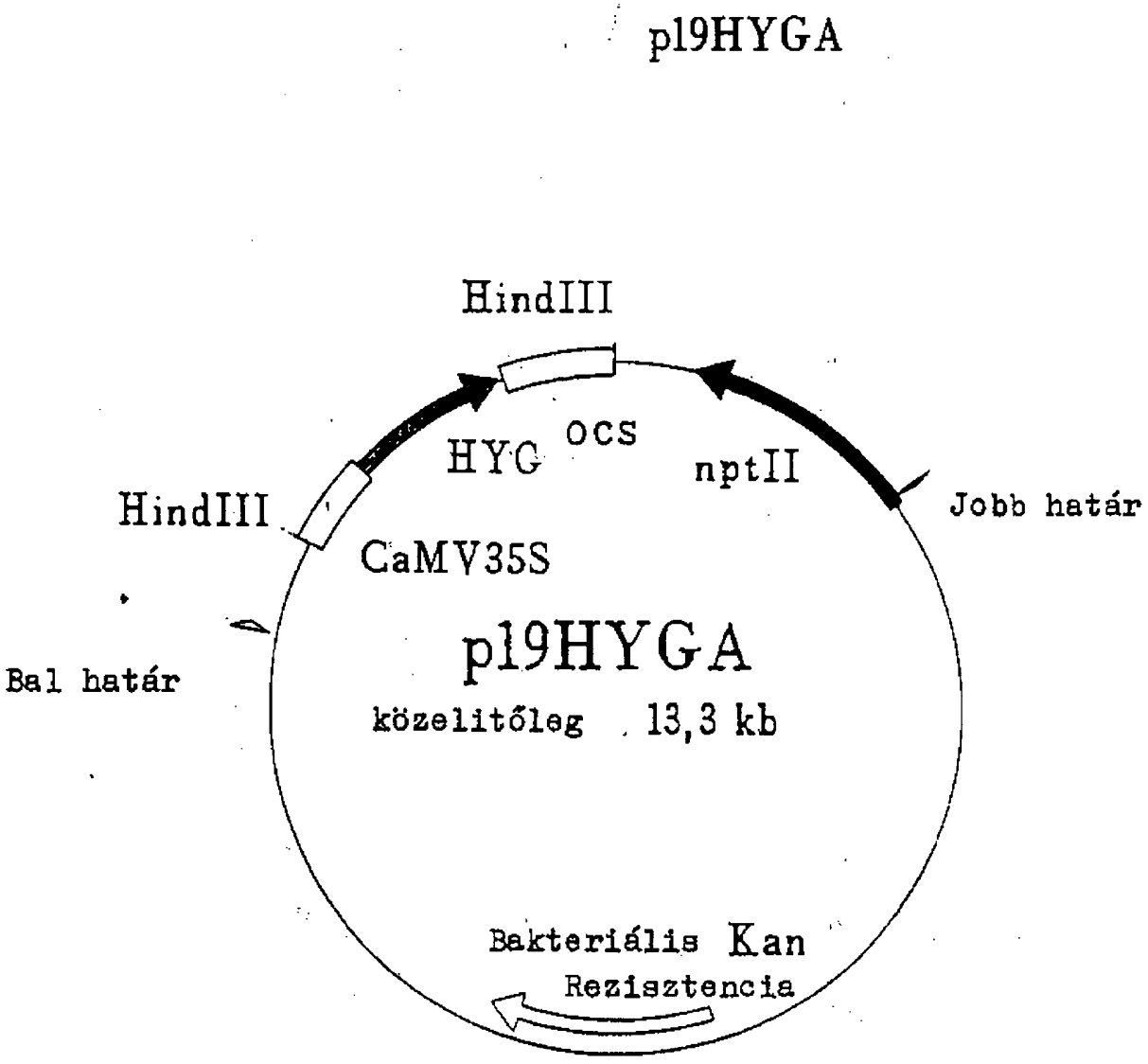


pBIN19Ri tartalmazza a vad nptII tipusu gént

Az EcoRI és HindIII orientációja a pBIN19Ri-ben forditott az eredeti pBIN19 plazmidhoz képest /M.Bevan, NAR vol 12, 8711-8721 /1984//.

6. ábra

A pl9HYGA szerkezete



CaMV35S = Karfiol mozaik virus 35S promoter

ocs = Oktipin szintáz 3' régió

Eredeti plazmid a pBIN19

7. ábra