

A keményítő szintézisében szerepet játszó, búzaeredetű  
enzimeket kódoló nukleinsavmolekulák

K I V O N A T

A találmány tárgyát képezik búzaeredetű, izoamiláz funkciójú fehérjét kódoló nukleinsavmolekulák és a nukleinsavmolekulákat tartalmazó vektorok. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti nukleinsavmolekulákat vagy vektorokat tartalmazó transzgénikus növényi sejtek és a transzgénikus növényi sejtekből regenerálható növények, amelyek megváltozott jellemvonású keményítőt szintetizálnak, szaporítóanyaguk, valamint az ezek előállítására szolgáló eljárások és alkalmazásuk keményítő előállítására.

A találmány szerinti sejtekből, növényekből, valamint szaporítóanyagukból nyerhető keményítő az élelmiszeriparban, valamint a csomagolóanyagok és az eldobható termékek gyártásánál alkalmazható.

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

"A2"



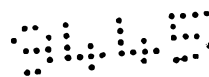
**A keményítő szintézisében szerepet játszó,  
búzaeredetű enzimeket kódoló nukleinsavmolekulák**

A találmány tárgyát képezik növényekben a keményítő szintézisében szerepet játszó, búzaeredetű enzimet, közelebbről egy izoamilázt kódoló nukleinsavmolekulák.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti nukleinsavmolekulákat tartalmazó vektorok, gazdaszervezetek, növényi sejtek és növények, a növények szaporítóanyaga, valamint alkalmazásuk keményítő előállítására.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás transzgénikus növények előállítására, amelyek a találmány szerinti nukleinsavmolekulák bevitelének köszönhetően megváltozott jellemvonású keményítőt szintetizálnak.

Az utóbbi években a növényi alkotórészek újrafeldolgozható nyersanyagokként egyre nagyobb jelentőségre tesznek szert, ezért a biotechnológiai kutatás egyik iránya ezeknek a növényi nyersanyagoknak a feldolgozóipar szükségleteihez történő adaptálása. Az újra feldolgozható nyersanyagoknak a

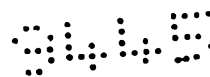


lehetséges legtöbb területen történő alkalmazásához anyagok széles skáláját kell előállítani.

Az olajokon, zsírokon és fehérjéken kívül a szénhidrátok a növényekből származó, legfontosabb, újra feldolgozható nyersanyagok. A cellulózon kívül a keményítő, amely a magasabbrendű növényekben egyike a legfontosabb raktározó anyagoknak, központi helyet foglal el a poliszacharidok között. Ebben a tekintetben a búza az egyik legfontosabb terménynövény, mivel az Európai Közösség teljes keményítőtermelésének körülbelül 20%-át biztosítja.

A poliszacharid keményítő kémiaiilag egyforma egységek, glükózmolekulák polimerje, azonban különböző molekulatípusok nagyon összetett keveréke, amelyek a polimerizáció fokában, a glükózláncok elágazásának előfordulásában és a lánchosszban különbözhetnek, és amelyek ezenkívül származékok is lehetnek, például foszforilált származékok. A keményítő tehát nem egy egységes nyersanyag. Különbség van az amilóz típusú keményítő - amely alapvetően el nem ágazó,  $\alpha$ -1,4-glükozid kötésekkel kötött glükózmolekulák polimerje - és az amilopektin típusú keményítő között, amely viszont különböző elágazásokat tartalmazó glükózláncok összetett keveréke. Az elágazások további  $\alpha$ -1,6-glükozid kötések kialakulásával jönnek létre. Búzában az amilóz típusú keményítő a szintetizálódott keményítő körülbelül 11-37%-át teszi ki.

Ahhoz, hogy megfelelő keményítők a lehető legszélesebb körben, a lehető legtöbb ipari célra alkalmazhatók legyenek, kívánatos olyan növényeket előállítani, amelyek a

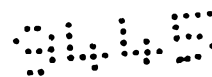


különböző felhasználásokra különösen alkalmas, módosított keményítőt szintetizálnak. Ilyen növények előállítására az egyik lehetőség növénynemesítési eszközök alkalmazása. A búza azonban jellemzően poliploid (tetra- vagy hexaploid), ezért növénynemesítéssel hatás kifejtése nagyon nehéz. Csak a közelmúltban sikerült egy "waxy" (amilózmentes) búzát előállítani természetesen előforduló mutánsok keresztezésével [Nakamura és mtsai., Mol. Gen Genet. 248, 253-259 (1995)].

A növénynemesítési eljárások mellett egy másik lehetőség a keményítőt előállító növények rekombináns módszerekkel történő, specifikus módosítása. Ennek azonban előfeltétele a keményítő szintézisében és/vagy a keményítő módosításában szerepet játszó enzimek azonosítása és jellemzése, és az ezeket az enzimeket kódoló nukleinsavmolekulák izolálása.

A keményítő szintéziséhez vezető bioszintetikus útvonalak alapvetően ismertek. A növényi sejtekben a keményítő szintézise a plasztiszokban történik. A fotoszintetikusán aktív szövetekben ezek a plasztiszok a kloroplasztiszok, a fotoszintetikusán inaktív, keményítőt raktározó szövetekben pedig az amiloplasztiszok.

A növényekben szintetizált keményítő elágazása mértékének rekombináns módszerekkel történő specifikus megváltoztatásához a keményítő anyagcseréjében részt vevő, előnyösen a keményítőmolekulákba az elágazások beviteléért vagy bontásáért felelős enzimeket kódoló DNS-szekvenciák azonosítása szükséges.



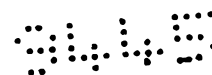
Az úgy nevezett Q-enzimek mellett, amelyek a keményítőmolekulákban elágazásokat alakítanak ki, az elágazások bontására képes enzimek is találhatók a növényekben. Ezeket az enzimeket elágazást bontó enzimeknek nevezik és szubsztrátspecifitásuk alapján három csoportra oszthatók:

a) a pullulanázok, amelyek a pullulánon kívül az amilopektint is hasznosítják szubsztrátként, mikroorganizmusokban, például *Klebsiellában*, és növényekben találhatók. Növényekben ezeket az enzimeket R-enzimeknek nevezik.

b) az izoamilázok, amelyek nem hasznosítják a pullulánt, hanem a glikogén és az amilopektin a szubsztrátjuk, szintén mikroorganizmusokban és növényekben találhatók. Izoamilázokat például kukoricában [Manners & Carbohydr. Res. 9, 107 (1969)] és burgonyában [Ishizaki és mtsai., Agric. Biol. Chem. 47, 771-779 (1983)] írtak le.

c) az amilo-1,6-glükozidázokat emlősökben és élesztőben írták le, és grenzdextrineket használnak szubsztrátként.

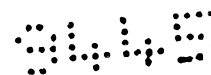
Cukorrépában Li és munkatársai [Plant Physiol. 98, 1277-1284 (1992)] csak egy, pullulanáz típusú, elágazást bontó enzimet tudtak kimutatni az öt endoamilázon és két exoamilázon kívül. Ez az enzim, amelynek mérete körülbelül 100 kD és a pH optimuma 5,5, a kloroplasztiszbán található. Spenótban szintén egy, elágazást bontó enzimet írtak le, amelynek pullulán a szubsztrátja. Mind a spenótban, mind a cukorrépában talált, elágazást bontó enzim aktivitása amilopektinnel történő reakció esetén ötször alacsonyabb, mint pullulanázzal [Ludwig és mtsai., Plant Physiol 74 856-



861 (1984); Li és mtsai., Plant Physiol. 98, 1277-1284 (1992)].

A mezőgazdaságilag fontos, keményítőt raktározó terménynövényben, a burgonyában az elágazást bontó enzim aktivitását Hobson és munkatársai vizsgálták [J. Chem. Soc. 1451 (1951)]. Sikeresen bizonyították, hogy a Q-enzimmel szemben ennek az enzimnek nincs lánchosszabbító aktivitása, csupán az  $\alpha$ -1,6-glükozid kötéseket hidrolizálja. Az enzimet részletesen leírni azonban még nem sikerült. Burgonya esetében az elágazást bontó enzim tisztítására szolgáló eljárásokat és a tisztított fehérje részleges peptidszekvenciáját már közölték (WO 95/04826). Spenótnál az elágazást bontó enzim tisztítását és a megfelelő cDNS izolálását időközben leírták [Renz és mtsai., Plant Physiol. 108, 1342 (1995)].

Kukoricában egyenlőre egy, elágazást bontó enzimnek csak a meglétét ismertették az irodalomban. Szubsztrátspecifitása alapján ezt az enzimet az izoamilázok csoportjához sorolják [lásd pl., Hannah és mtsai., Scientia Horticulturae 55, 177-197 (1993) vagy Garwood, Starch Chemistry and Technology, 25-86 szerk.: Whistler, R. L., BeMiller, J. N., Puschall, E. F., kiad.: Academic Press San Diego, New York, Boston (1994)]. A megfelelő mutáns neve "sugary". A "sugary" lokusz génjét a közelmúltban klónozták [James és mtsai., Plant Cell 7, 417-429 (1995)]. Kukoricában a "sugary" lokuszon kívül nem ismert más génlokusz, amely elágazást bontó enzim aktivitásával bíró fehérjét kódolna. Jelenleg annak sincs jele, hogy más, elágazást bontó



enzimforma előfordulna kukoricában. Ha olyan transzgénikus kukoricát kívánunk előállítani, amelyben már nincs semmilyen elágazást bontó enzimaktivitás, például az amilopektin típusú keményítő elágazási mértékének fokozása érdekében, azonosítani kell valamennyi, kukoricában előforduló, elágazást bontó enzimformát és izolálni kell a megfelelő géneket vagy cDNS-szekvenciákat.

Bármilyen keményítőt raktározó növény, előnyösen gabonafélék, előnyösebben búza oly módon történő megváltoztatásához, hogy módosított keményítőt szintetizáljon, további lehetőségként minden esetben azonosítani kell az elágazási enzimek további izoformáit kódoló DNS-szekvenciákat.

A találmány szerinti megoldás célja tehát olyan, előnyösen búzából származó nukleinsavmolekulák előállítása, amelyek a keményítő bioszintézisében szerepet játszó enzimeket kódolnak, és amelyek olyan, genetikailag módosított növények előállítását teszik lehetővé, amelyek megváltozott kémiai és/vagy fizikai tulajdonságú növényi keményítőt állítanak elő.

A találmány célját a szabadalmi igénypontokban ismertetett alkalmazási formákkal valósítottuk meg.

A találmány tárgyát képezi egy nukleinsavmolekula, amely búza izoamiláz funkciójával bíró fehérjét kódol, előnyösen egy olyan fehérjét, amelyet alapvetően a 3. vagy 7. azonosítószámú szekvenciákban bemutatott aminosavszekvenciákkal határozzunk meg. Előnyösen a találmány tárgyát képezi egy nukleinsavmolekula, amely az 1., 2. vagy 6. azonosítószámú szekvenciákban bemutatott nukleotidszekvenciákat



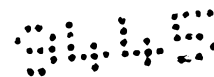
vagy ezek egy részét tartalmazza, előnyösen az 1., 2. vagy 6. azonosítószámú szekvenciákban bemutatott kódoló szakaszt tartalmazó molekula és a megfelelő ribonukleotid-szekvenciák. Különösen előnyös egy olyan nukleinsavmolekula, amely továbbá olyan szabályozó elemeket is tartalmaz, amelyek a nukleinsavmolekulák transzkripcióját és megfelelő esetben a transzlációját biztosítják. A találmány tárgyát képezi továbbá egy nukleinsavmolekula, amely a találmány szerinti nukleinsavmolekulákkal hibridizál.

A találmány tárgyát képezi továbbá búzaeredetű izoamilázt kódoló nukleinsavmolekula, amelynek szekvenciája az előzőekben ismertetett molekulák nukleotidszekvenciájától a genetikai kód degenerációja miatt különbözik.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy nukleinsavmolekula, amelynek szekvenciája az előzőekben ismertetett szekvenciák egyikének teljes egészével vagy egy részével komplementer.

A leírás szerinti értelemben a "hibridizáció" kifejezésen a hagyományos hibridizációs körülmények között, előnyösen sztringens körülmények között végzett hibridizációt értünk, amelynek ismertetése például Sambrook és munkatársai könyvében található [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiad., kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)].





A "hibridizáció" előnyösen a következő körülmények között történik:

Hibridizációs puffer: 2 X SSC, 10 X Denhardt-oldat (Fikoll 400 + PEG + BSA, 1:1:1), 0,1% SDS, 5 mmol EDTA, 50 mmol dinátrium-hidrogénfoszfát, 250 µg/ml hering sperma DNS, 50 µg/ml tRNS, vagy 0,25 mol nátrium-foszfát puffer, pH 7,2, 1 mmol EDTA, 7% SDS

Hibridizációs hőmérséklet:  $T = 65^{\circ}\text{C}$ – $70^{\circ}\text{C}$

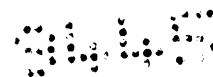
Mosó puffer: 0,2 x SSC, 0,1% SDS

Mosási hőmérséklet:  $T = 40^{\circ}\text{C}$ – $75^{\circ}\text{C}$

A találmány szerinti nukleinsavmolekulákkal hibridizáló nukleinsavmolekulák elvileg bármilyen, ilyen fehérjéket expresszáló búzanövényből származó izoamilázokat kódolhatnak.

A találmány szerinti molekulákkal hibridizáló nukleinsavmolekulák például búza vagy búza növényi szövetének genomi könyvtárából vagy cDNS-könyvtárából izolálhatók. Egy másik lehetőségként rekombináns eljárásokkal állíthatók elő vagy kémiaiilag megszintetizálhatók.

Ilyen nukleinsavmolekulák azonosítása és izolálása a találmány szerinti molekulák vagy ezen molekulák egy részének vagy ezen molekulák fordított komplementerének alkalmazásával hajtható végre, például a hagyományos eljárásokkal történő hibridizációval [lásd például, Sambrook és mtsai., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiad., kiad.:



Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)].

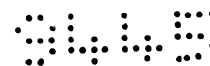
Hibridizációs próbaként például olyan nukleinsav-molekulák alkalmazhatók, amelyeknek nukleotidszekvenciája pontosan vagy alapvetően azonos az 1., a 2. vagy a 6. azonosítószámú szekvenciák szerinti nukleotidszekvenciákkal vagy ezen szekvenciák egy részével. A hibridizációs próbaként alkalmazott fragmensek lehetnek hagyományos szintetikus technológiák segítségével előállított szintetikus fragmensek, amelyeknek szekvenciája alapvetően megegyezik a találmány szerinti nukleinsavmolekula szekvenciájával.

A találmány szerinti nukleinsavmolekulákkal hibridizáló molekulák közé tartoznak az előzőekben ismertetett, találmány szerinti, búzaeredetű izoamilázt kódoló nukleinsavmolekulák fragmensei, származékai és allélikus variánsai. A fragmenseken nukleinsavmolekulák részeit értjük, amelyek elegendő hosszúságúak ahhoz, hogy az ismertetett fehérjéket kódolják. A leírás szerinti értelemben származék kifejezésen azt értjük, hogy ezeknek a molekuláknak a szekvenciája az előzőekben ismertetett nukleinsavmolekulák szekvenciájától egy vagy több helyen eltér, és magas fokú homológiát mutat ezekkel a szekvenciákkal. A homológián legalább 40%-os, előnyösen legalább 60%-os, előnyösen 80%-nál nagyobb, különösen előnyösen 90%-nál nagyobb szekvencia-azonosságot értünk. Az előzőekben ismertetett nukleinsavmolekuláktól való eltérések delécióból, szubsztitúcióból, inszercióból vagy rekombinációból származhatnak.

A homológia továbbá funkcionális és/vagy szerkezeti azonosságot is jelent a kérdéses nukleinsavmolekulák vagy az általuk kódolt fehérjék között. A nukleinsavmolekulák, amelyek az előzőekben ismertetett molekulákkal homológok és ezeknek a molekuláknak a származékai, rendszerint ezeknek a molekuláknak ugyanolyan biológiai funkciót kifejtő módosulásai. Ezek lehetnek természetesen előforduló változatok, például más szervezetekből származó szekvenciák, vagy mutációk, amelyek természetesen előforduló mutációk vagy irányított mutagenézissel kiváltott mutációk lehetnek. A változatok továbbá szintetikusan előállított szekvenciák is lehetnek. Az allélikus variánsok természetesen előforduló variánsok és szintetikusan vagy rekombináns DNS-technológiákkal előállított variánsok lehetnek.

A találmány szerinti nukleinsavmolekulák különböző változatai által kódolt izoamilázok bizonyos jellemzői azonosak. Például az enzimaktivitás, a molekulasúly, az immunológiai reakcióképesség, a konformáció és hasonló, vagy fizikai tulajdonságok, például gélelektroforézisnél a migrációs viselkedés, a kromatográfiás viselkedés, a szedimentációs koefficiens, az oldhatóság, a spektroszkópiai jellemzők, a töltési jellemzők, a stabilitás, a pH optimum, a hőmérsékleti optimum és hasonló.

A találmány szerinti nukleinsavmolekulák által kódolt fehérje egy búzaeredetű izoamiláz. Ezek a fehérjék bizonyos fokú hasonlóságot mutatnak más növényfajtákból származó, már ismert izoamilázokkal.



A találmány szerinti nukleinsavmolekulák lehetnek DNS-molekulák, előnyösen cDNS vagy genomi molekulák. A találmány szerinti nukleinsavmolekulák lehetnek továbbá RNS-molekulák, amelyek például a találmány szerinti nukleinsavmolekulák transzkripciójából származnak. A találmány szerinti nukleinsavmolekulák például természetes forrásokból nyerhetők, vagy rekombináns technológiákkal állíthatók elő, vagy megszintetizálhatók.

A találmány tárgyát képezik még a találmány szerinti nukleinsavmolekulával specifikusan hibridizáló oligonukleotidok. Ezek az oligonukleotidok előnyösen legalább 10 nukleotid, előnyösen legalább 15 nukleotid és különösen előnyösen legalább 50 nukleotid hosszúak. A találmány szerinti oligonukleotidok a találmány szerinti nukleinsavmolekulákkal specifikusan hibridizálnak, azaz nem hibridizálnak vagy csak nagyon kis mértékben hibridizálnak más fehérjéket, előnyösen más izoamilázokat kódoló nukleinsavszekvenciákkal. A találmány szerinti oligonukleotidok például láncindítóként alkalmazhatók PCR-reakcióhoz vagy hibridizációs próbaként a rokon gének izolálására. Alkotórészei lehetnek továbbá antiszensz konstrukcióknak vagy megfelelő ribozimokat kódoló DNS-molekuláknak.

A találmány tárgyát képezik továbbá az előzőekben ismertetett, találmány szerinti nukleinsavmolekulákat tartalmazó vektorok, előnyösen plazmidok, kozmidok, fagmidok, vírusok, bakteriofágok és más, a géntechnológiában szokásosan alkalmazott vektorok. Az ilyen vektorok pro- vagy eukarióta



sejtek transzformálására, előnyösen növényi sejtek transzformálására alkalmazhatók.

A vektorok előnyösen lehetővé teszik a találmány szerinti nukleinsavmolekulák integrációját a növényi sejt genomjába, adott esetben szegélyező, szabályozó szakaszokkal együtt. Ilyenek például a bináris vektorok, amelyek *Agrobaktérium* közvetítette géntranszferben alkalmazhatók. Előnyösen a találmány szerinti nukleinsavmolekulák szensz vagy antiszensz irányban történő integrációja eredményezi, hogy transzlatálható vagy adott esetben nem transzlatálható RNS szintetizálódik a pro- vagy eukarióta sejtekben.

A "vektor" kifejezésen általában a szakember által ismert, megfelelő segédeszközt értjük, amely lehetővé teszi egy egyszálú vagy kettős szálú nukleinsavmolekula irányított átvitelét egy gazdasejtbe, például egy DNS- vagy RNS-vírus, egy vírusfragmens, egy plazmidkonstrukció, amely szabályozó elemek jelenlétében vagy hiányában alkalmas a nukleinsavnak a sejtekbe történő átvitelére, vagy segédanyagok, mint üvegszálak vagy fémrészecskék, amelyek például a részecskeágyú eljárásban alkalmazhatók, de a kifejezésen olyan nukleinsavmolekulát is értünk, amely kémiai vagy fizikai eljárásokkal közvetlenül a sejtbe juttatható.

Egy előnyös megvalósítási mód szerint a vektorban lévő nukleinsavmolekulák olyan szabályozó elemekkel vannak kapcsolva, amelyek egy transzlatálható RNS transzkripcióját és szintézisét teszik lehetővé pro- vagy eukarióta sejtekben, vagy amelyek, kívánt esetben, egy át nem írható RNS szintézisét biztosítják.



A találmány szerinti nukleinsavmolekulák expressziója prokarióta sejtekben, például *Escherichia coliban*, fontos az ezen molekulák által kódolt enzimek enzimatiszus aktivitásának részletesebb jellemzése érdekében. Előnyösen a kérdéses enzim által szintetizált termék a növényi sejtekben a keményítő szintézisében szerepet játszó, más enzimek hiányában írható le. Ez a működésre vonatkozó olyan következtetések levonását teszi lehetővé, hogy a kérdéses fehérje a növényi sejtben a keményítő szintézise folyamán milyen működést fejt ki.

A találmány szerinti nukleinsavmolekulákba különböző mutációk vihetők be a molekuláris biológiában szokásos technológiákkal [lásd pl., Sambrook és mtsai., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiad., kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)], amely megváltozott biológiai tulajdonságú fehérjék szintézisét eredményezheti. Egy ilyen lehetőség egyrészt deléciós mutánsok előállítása, amelyekben olyan nukleinsavmolekulákat alakítunk ki, amelyekben a kódoló DNS-szekvencia 5' vagy 3' végében egymást követő deléciókat hozunk létre, amely ennek megfelelően csonka fehérjék szintézisét eredményezi. A nukleotidszekvencia 5'-végén levő ilyen deléciók segítségével azonosíthatók az enzimnek a plaziszokba történő áthelyeződéséért felelős aminosavszekvenciák (tranzitpeptidek). Ez lehetővé teszi olyan enzimek irányított szintézisét, amelyek a kérdéses szekvenciák eltávolításának köszönhetően már nem a plaztiszban lokalizálódnak,

hanem a citoszolban, vagy amelyek más szignálszekvenciák hozzáadásával más kompartmentekben lokalizálódnak.

Másrészről pontmutációk is bevihetők olyan helyekre, ahol a megváltozott aminosavszekvencia kihat például az enzimaktivitásra vagy az enzimszabályozásra. Ilyen módon előállíthatók például olyan mutánsok, amelyeknek megváltozott a  $K_m$ -értéke vagy amelyeket már nem szabályoznak a sejtben normál esetben működő szabályozó mechanizmusok allosztérikus reguláció vagy kovalens módosítás útján.

Előállíthatók továbbá olyan mutánsok, amelyekben a találmány szerinti fehérjének megváltozott a szubsztrát- vagy termékspecifitása. Előállíthatók továbbá olyan mutánsok, amelyekben megváltozott a találmány szerinti fehérje aktivitás-hőmérséklet profilja.

Prokarióta sejtek rekombináns módosításának kivitelezése érdekében a találmány szerinti nukleinsavmolekulák vagy ezen molekulák részei plazmidokba vihetők, amelyek lehetővé teszik a mutagenézist, vagy egy rekombináns DNS-szekvenciákkal megváltoztatandó szekvenciába vihetők. Bázisok cserélhetők ki, vagy természetes vagy szintetikus szekvenciák adhatók hozzá a hagyományos eljárásokkal [Sambrook és mtsai., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiad., kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)]. A DNS-fragmensek egymáshoz kapcsolása érdekében adapterek vagy kapcsolók csatlakoztathatók a fragmensekhez. Olyan műveletek is végezhetők továbbá, amelyekkel megfelelő restriktációs hasítóhelyek építhetők ki, vagy felesleges DNS-szakaszok vagy restriktációs hasítási

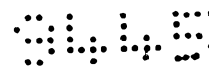
helyek szüntethetők meg. Ahol inszerciók, deléciók vagy szubsztitúciók megfelelőek, *in vitro* mutagenesis, láncindító-javítás, restrikció vagy ligálás alkalmazható. Az általánosan alkalmazott analitikai eljárások a szekvenciaanalízis, a restrikciós analízis vagy a biokémia és a molekuláris biológia más eljárásai.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát képezik a gazdasejtek, előnyösen pro- vagy eukarióta sejtek, amelyeket az előzőekben ismertetett, találmány szerinti nukleinsavmolekulával vagy találmány szerinti vektorral transzformáltunk, és a sejtek, amelyek az ily módon transzformált sejtekből képződnek és tartalmazzák a találmány szerinti nukleinsavmolekulát vagy vektort. Előnyösen pro- vagy eukarióta sejtek, előnyösen növényi sejtek.

A találmány tárgyát képezik továbbá az izoamiláz aktivitású fehérjék, amelyeket a találmány szerinti nukleinsavmolekulák kódolnak, és amelyek rekombináns technológiával készíthetők, valamint eljárások ezek készítésére, amely eljárás során a találmány szerinti gazdasejtet a szakember számára ismert, megfelelő körülmények között tenyésztjük, amely lehetővé teszi a találmány szerinti fehérje szintézisét, majd ezt követően a gazdasejtekből és/vagy a tápközegből történő izolálását.

A találmány szerinti nukleinsavmolekulák birtokában lehetőség nyílik arra, hogy rekombináns technológiák segítségével irányított módon beleavatkozzunk növényekben a keményítő-anyagcserébe, és oly módon megváltoztassuk, hogy a





megváltozott szintézis eredményeképpen olyan keményítő jöjjön létre, amelynek fizikai-kémiai tulajdonságai, például az amilóz/amilopektin arány, az elágazás mértéke, az átlagos lánchossz, a foszfáttartalom, a zselatinosodási viselkedés, a gél- vagy filmképző tulajdonságok, a keményítőszemcse mérete és/vagy a keményítőszemcse alakja, megváltoztak az ismert keményítőhöz képest.

A találmány szerinti nukleinsavmolekulák növényi sejtekben expresszálhatók a kérdéses izoamiláz aktivitásának fokozása érdekében, vagy olyan sejtekbe vihetők, amelyekben természetes állapotban nem expresszálódik ez az enzim. A találmány szerinti nukleinsavmolekulák expressziójával a találmány szerinti izoamiláz természetes aktivitásának szintje is csökkenthető a növényi sejtekben. A találmány szerinti nukleinsavmolekulák továbbá oly módon módosíthatók a szakember számára ismert eljárásokkal, hogy olyan találmány szerinti izoamilázokat kapjunk, amelyeket többé nem befolyásolnak a sejt belső szabályozó mechanizmusai, vagy amelyeknek megváltozott a hőmérséklet-aktivitás profilja vagy a szubsztrát- vagy a termékspecifitása.

A találmány szerinti nukleinsavmolekulák növényekben történő expresszálásával elvileg elérhető, hogy a szintetizálódó fehérje a növényi sejt bármelyik kívánt kompartmentjében lokalizálódjon. Egy bizonyos kompartmentben történő lokalizáció érdekében a plasztiszokban történő lokalizációt biztosító szekvenciát ki kell vágni és a megmaradt kódoló szakaszt kell - szükség esetén - olyan DNS-szekvenciákkal kapcsolni, amelyek a kérdéses kompartmentben

történő lokalizációt biztosítják. Ilyen szekvenciák ismertek [lásd például, Braun és mtsai., EMBO J. 11, 3219-3227 (1992); Wolter és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 846-850 (1988); Sonnewald és mtsai., Plant J. 1, 95-106 (1991)].

A találmány tárgyát képezi tehát eljárás olyan transzgénikus növényi sejtek előállítására, amelyeket a találmány szerinti nukleinsavmolekulával vagy vektorral transzformálunk, és ahol a találmány szerinti nukleinsavmolekula vagy vektor a növényi sejt genomjába integrálódik, valamint a transzgénikus növényi sejtek, amelyeket a találmány szerinti nukleinsavmolekula vagy vektor alkalmazásával transzformáltunk, és az ily módon transzformált sejtekből származó transzgénikus növényi sejtek. A találmány szerinti sejtek egy vagy több találmány szerinti nukleinsavmolekulát vagy vektort tartalmaznak, és ezek előnyösen olyan szabályozó DNS-elemekhez vannak kapcsolva, amelyek a növényi sejtekben történő transzkripcióját biztosítják, előnyösen egy megfelelő promóterhez vannak kapcsolva. Ilyen sejtek a természetesen előforduló növényi sejtektől többek között azáltal különböztethetők meg, hogy a találmány szerinti nukleinsavmolekulát tartalmazzák, amely természetes állapotban nem fordul elő ezekben a sejtekben, vagy azáltal, hogy egy ilyen molekula a sejt genomjában olyan helyzetbe épült be, ahol máskülönben nem fordul elő, azaz eltérő genomi környezetbe. A találmány szerinti transzgénikus növényi sejtek a természetesen előforduló növényi sejtektől továbbá azáltal is megkülönböztethetők, hogy ezek a sejtek

a találmány szerinti nukleinsavmolekula legalább egy kópiáját tartalmazza stabilan a genomba beépülve, adott esetben a sejtekben természetes módon előforduló ilyen molekula kópiáin felül. Ha a sejtekbe bevitt nukleinsavmolekula/nukleinsavmolekulák a sejtekben természetes módon már megtalálható molekulákon túl további kópia/kópiák, akkor a találmány szerinti növényi sejtek a természetesen előforduló növényi sejtektől előnyösen azáltal különböztethetők meg, hogy ez a további kópia vagy ezek a további kópiák a genomban olyan helyen találhatók, ahol természetes állapotban nem fordul(nak) elő. Ez például Southern-blot vizsgálattal ellenőrizhető.

Ha a növényi genomba bevitt, találmány szerinti nukleinsavmolekula heterológ a növényi sejttel, a transzgenikus növényi sejtek a találmány szerinti nukleinsavmolekulák transzkriptumait állítják elő, amelyek egyszerű módon kimutathatók a szakember számára ismert eljárásokkal, például Northern-blot vizsgálattal.

Ha a bevitt, találmány szerinti nukleinsavmolekula homológ a növényi sejttel, akkor a találmány szerinti sejtek a természetesen előforduló sejtektől például a találmány szerinti nukleinsavmolekulák fokozott expressziója alapján különböztethetők meg. A transzgenikus növényi sejtek előnyösen a találmány szerinti nukleinsavmolekulák több transzkriptumát tartalmazza. Ez például Northern-blot vizsgálattal mutatható ki. A leírás szerinti értelemben a "több" kifejezésen előnyösen legalább 10%-nál több, előnyösen legalább 20%-nál több, különösen előnyösen legalább

50%-nál több transzkriptumot értünk a megfelelő, nem transzformált sejtekkel összehasonlítva. A sejtek továbbá előnyösen a találmány szerinti fehérje aktivitásának megfelelő növekedését vagy csökkenését mutatják (legalább 10%, 20% vagy 50%). A transzgénikus növényi sejtek ép növényekké regenerálhatók a szakember számára ismert technológiák szerint.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás olyan transzgénikus növények előállítására, amelyekben egy vagy több találmány szerinti nukleinsavmolekula vagy vektor integrálva van a növényi sejt genomjába és a növényi sejtből teljes növényt regenerálunk. A találmány tárgyát képezik továbbá az előzőekben ismertetett, transzgénikus növényi sejteket tartalmazó növények. Elvileg a transzgénikus növények bármilyen növényfajhoz tartozhatnak, azaz nemcsak egyszikű, hanem kétszikű növények is lehetnek. Előnyösen haszonnövények, előnyösen keményítőt szintetizáló vagy raktározó növények, különösen előnyösen rozs, árpa, zab, búza, cirok és köles, szágó, kukorica, rizs, borsók, velőborsó, manióka, burgonya, paradicsom, olajmag repce, szójabab, kender, len, napraforgó, tehénborsó vagy nyílgyökér, előnyösen búza, kukorica, rizs és burgonya.

A találmány tárgyát képezik a találmány szerinti növények szaporítóanyagai, például termések, magok, gumók, gyökértörzs, magoncok, dugványok, kalluszkok, protoplasztok, sejt kultúrák és hasonlóak.



A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás módosított keményítő előállítására, amely során az előzőekben ismertetett, találmány szerinti növényből és/vagy egy ilyen növény keményítőt raktározó részeiből keményítőt vonunk ki.

A növényekből, előnyösen búzából vagy a növények keményítőt raktározó részeiből a keményítő kivonására szolgáló eljárások a szakember számára ismertek [lásd például, Eckhoff és mtsai., *Cereal Chem.* 73, 54-57 (1996); *Starch: Chemistry and Technology*, 2. kiad., szerk.: Whistler, BeMiller és Paschall, kiad.: Academic Press Inc. London Ltd. (1994), ISBN 0-12-746270-8, lásd pl., Watson, "Corn and sorghum starches: production", XII. fejezet 412-468; Corbishley és Miller, "Tapioca, arrowroot and sago starches: production", XIII. fejezet 468-479; Mitch, "Potato starch: production and uses", XIV. fejezet 479-490; Knight és Oson, "Wheat starch: production, modification and uses", XV. fejezet 491-506; Rohmer és Klem, "Rice starch: production and uses", XVI. fejezet 507-528]. Növényi anyagból a keményítő kivonására szolgáló, általánosan alkalmazott eszközök a szeparátorok, a derítők, a hidrociklonok, az aeroszolszáritók és a folyékonyágyas száritók.

A találmány szerinti nukleinsavmolekula expressziójának köszönhetően a találmány szerinti, transzgénikus, növényi sejtek és növények olyan keményítőt szintetizálnak, amelynek fizikai-kémiai tulajdonságai, például az amilóz/amilopektin arány, az elágazás mértéke, az átlagos lánchossz, a foszfáttartalom, a zselatinosodási viselkedés, a keményítőszemcse mérete és/vagy a keményítőszemcse alakja



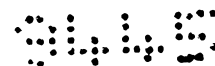
megváltozott a vad típusú növényekben szintetizált keményítővel összehasonlítva. Az ilyen keményítőnél előnyösen megváltozhat az ilyen keményítőből készített gélek viszkozitása és/vagy a film- vagy gélképző tulajdonságai az ismert keményítőkkal összehasonlítva.

A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti növényi sejtekből, növényekből és a szaporítóanyagukból nyerhető keményítő, és a keményítő, amely az előzőekben ismertetett, találmány szerinti eljárással nyerhető.

A találmány szerinti nukleinsavmolekulák segítségével előállíthatók továbbá növényi sejtek és növények, amelyekben a találmány szerinti fehérje aktivitása csökkent. Ez szintén megváltozott fizikai-kémiai tulajdonságú keményítő szintézisét eredményezi a vad típusú növényi sejtekből származó keményítővel összehasonlítva.

A találmány egy további tárgyát képezi tehát a találmány szerinti nukleinsavmolekulát tartalmazó transzgénikus növényi sejt, amelyben az izoamiláz aktivitása csökkent a nem transzformált sejtekhez képest.

Csökkent izoamiláz aktivitású növényi sejtek a találmány szerinti nukleinsavmolekulák alkalmazásával, a szakember számára ismert eljárásokkal nyerhetők például egy megfelelő antiszensz RNS expresszálásával, koszuppressziós hatást biztosító szensz RNS-sel vagy egy megfelelően kialakított ribozim expresszálásával, amely specifikusan hasít izoamilázt kódoló transzkriptumokat [lásd pl., Jorgensen, Trends Biotechnol. 8, 340-344 (1990); Niebel és mtsai., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197, 91-103 (1995); Flavell



és mtsai., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197, 43-46 (1995), Palaqui és Vaucheret, Plant Mol. Biol. 29, 149-159 (1995); Vaucheret és mtsai., Mol. Gen. Genet. 248, 311-317 (1995); de Borne és mtsai., Mol. Gen. Genet. 243, 613-621 (1994)].

A találmány szerinti izoamiláz aktivitásának csökkentése érdekében előnyös csökkenteni a növényi sejtekben az ezt az enzimet kódoló transzkriptumok számát például egy antiszensz RNS expresszáásával.

Egyrészt a találmány szerinti fehérjét kódoló teljes szekvenciát tartalmazó DNS-molekula alkalmazható, az esetleg meglévő szegélyező szekvenciákkal együtt, vagy a kódoló szekvenciának csak részeit tartalmazó DNS-molekulák alkalmazhatók, ebben az esetben ezeknek a részeknek elegendő hosszúaknak kell lenniük ahhoz, hogy antiszensz hatást fejtsenek ki a sejtekben. Általában minimálisan 15 bp, előnyösen 100-500 bp nagyságú szekvenciák alkalmazhatók hatékony antiszensz gátlás kifejtése érdekében, előnyösen 500 bázispárnál nagyobb szekvenciák alkalmazhatók. Rendszerint 5000 bázispárnál rövidebb, előnyösen 2500 bázispárnál rövidebb szekvenciákat alkalmazunk.

A találmány szerinti DNS-molekulák szekvenciájával nagy mértékben homológ, de nem teljesen azonos DNS-szekvenciák is alkalmazhatók. A minimális homológiának el kell érnie a körülbelül 65%-ot. A 95-100%-ban homológ szekvenciák alkalmazása előnyös.

A találmány tárgyát képezi eljárás módosított keményítő előállítására, amely során a találmány szerinti sejtből vagy növényből és/vagy egy ilyen növény keményítőt raktározó részeiből keményítőt vonunk ki.

A találmány tárgyát képezi továbbá a találmány szerinti sejtekből vagy növényekből és a szaporítóanyagukból vagy részeikből nyerhető keményítő, és a találmány szerinti eljárással nyerhető keményítő.

A találmány szerinti keményítők a szakember számára ismert eljárásokkal módosíthatók, és módosítatlan vagy módosított formájukban az élelmiszeripar vagy az élelmiszeriparon kívüli területeken széles körben alkalmazhatók.

Elvileg a találmány szerinti keményítők lehetséges alkalmazásai két fontos területre oszthatók. Az egyik terület a keményítő hidrolizátumait öleli fel, elsősorban a glükózt és a glükán egységeket, amelyek enzimes vagy kémiai eljárásokkal nyerhetők. Ezek további kémiai módosításokhoz és eljárásokhoz, például fermentációhoz kiindulási anyagul szolgálnak. A költségek csökkentését szolgálná egy egyszerű és gazdaságosan megtervezett hidrolízis eljárás. Jelenleg ez alapvetően enzimesen történik, amiloglukozidázok alkalmazásával. Pénzügyi megtakarítás kevesebb enzim alkalmazásával lehetséges. Ez a keményítő szerkezetének megváltoztatásával érhető el, például a szemcse felületi területének megnövelésével, jobb emészthetőséggel, például a kisebb mértékű elágazásoknak vagy térbeli szerkezetnek köszönhetően, amely meghatározza az alkalmazott enzim hozzáférhetőségét.



A másik terület, ahol a találmány szerinti keményítő alkalmazható, az úgynevezett natív keményítő, amely a polimer szerkezetének köszönhetően további két felhasználási területre osztható.

### 1. Az élelmiszeripar

A keményítő sok élelmiszerben hagyományos adalékanyag, amelyekben a funkciója alapvetően a vizes alkotórészek megkötése, vagy fokozottabb viszkozitás vagy fokozottabb gélesedés kialakítása. Fontos jellemzők a reológia, az elnyelési jellemzők, a duzzadási hőmérséklet, a zselatinosodási hőmérséklet, a viszkozitás, a sűrítőképesség, a keményítő oldhatósága, az átlátszóság és a gél szerkezet, a hőmérsékleti stabilitás, a nyírési stabilitás, a savállóság, a degenerálódásra („retrogradation”) való hajlam, a filmképző képesség, a fagyasztási-olvasztási stabilitás, a viszkozitás állandósága sóoldatokban, az emészthetőség és a komplexképző képesség, például szervetlen vagy szerves ionokkal.

### 2. Nem élelmiszeripari terület

Ezen a hatalmas területen a keményítő segédanyagként alkalmazható különböző feldolgozási folyamatoknál vagy adalékanyagként az ipari termékekben. A keményítő segédanyagként történő alkalmazásánál elsősorban a papír- és kartonipart kell megemlíteni. A keményítőt elsősorban visszatartásra alkalmazzák (a szilárd részek visszatartására), a töltőanyagok és a finom részek kötésére merevítő anyagként, valamint dehidratálásra alkalmazzák. A keményítő kedvező tulajdonságait alkalmazzák, azaz a merevségét, az erőssé-



gét, a szilárdságát, a tapintását, a fényét, a lágyágát, a kötési erősségét és a felületét.

### 2.1 Papír- és kartonipar

A papírkészítési folyamatokon belül négy felhasználási területet kell megkülönböztetni, úgymint felületi kezelés, bevonás, pépesítés és porlasztás. A keményítővel szembeni követelmények a felületi kezelésnél alapvetően a nagyfokú fehérség, az igazított viszkozitás, a magas viszkozitási stabilitás, a jó filmképző képesség és a kis mértékű porképzés. A bevonásnál a szilárd anyagok tartalma, a megfelelő viszkozitás, a magas fokú kötési képesség és a festék iránti erős affinitás játszik fontos szerepet. A pépesítésnél adalékanyagként történő alkalmazásban nagy jelentősége van a gyors, egyenletes, veszteségmentes eloszlásának, a nagy mechanikai szilárdságának és a papírszövedékben történő teljes megmaradásának. A keményítőnek a porlasztás („spraying”) területén történő alkalmazásánál ismét az igazított szilárdanyag-tartalom, a magas viszkozitás és az erős kötési képesség fontos.

### 2.2 Ragasztóipar

A keményítők egyik fontos felhasználási területe a ragasztóipar, ahol a lehetséges alkalmazás négy alterületre osztható: a tiszta keményítőpaszta alkalmazása, a speciális vegyszerekkel kezelt keményítőpaszta alkalmazása, a keményítőnek adalékanyagként történő alkalmazása szintetikus gyantákhoz és polimer diszperziókhoz, és a keményítőnek szaporítóanyagként történő alkalmazása szintetikus ragasztóknál. A keményítő alapú ragasztók 90%-át a hullámpapír-



termelés, a papírzacskók és -zsákok előállítása, a papír és alumínium összetett anyagok előállítása, kartondobozok gyártása és borítékok és bélyegek számára ragasztóanyagok előállítása és hasonlók területén alkalmazzák.

### 2.3 Textilipar és textilápolási termékek ipara

A keményítőnek segédanyagként és adalékanyagként történő alkalmazásának egyik fontos területe a textil és textil ápolási anyagok termelésének területe. A textiliparon belül a következő négy terület különböztethető meg: a keményítőnek írező anyagként történő alkalmazása, azaz segédanyagként a dekatálásnál („smoothing”) és a dekatálási viselkedés erősítésére a szövés során alkalmazott nyújtó erőktől való védelem érdekében, valamint a szövés során a kopásállóság növelése érdekében, a keményítőnek textil kikészítő anyagként történő alkalmazása, előnyösen minőséget rontó előkezelések után, például fehérítés, festés és hasonlók után, a keményítőnek sűrítő anyagként történő alkalmazása a festékpaszták készítésénél a színfolyás megakadályozására, és a keményítőnek adalékanyagként történő alkalmazása fényező anyagokhoz a varrófonalaknál.

### 2.4 Építőanyagok ipara

A keményítőnek adalékanyagként történő felhasználásának negyedik területe az építőanyagok előállítása. Például a gipszkartonlapok gyártása, ahol a gipszpéppel kevert keményítő a vízzel gélts képez, a gipszmag felületére diffundál és ott összeköti a kartont a maggal. A keményítő felhasználásának egy másik területe a vakolathoz és ásványi rostanyagokhoz történő keverése. A kész betonkeveréknél a



keményítőtermékeket a kötés lassítása érdekében alkalmaz-  
zák.

### 2.5 Talajstabilizálás

A keményítőtermékek egy másik piaca a talajstabilizá-  
lók termelése, amelyeket a talajrészecskéknek a víztől való  
átmeneti védelmére alkalmaznak, amikor a talajt mesterséges-  
sen megforgatják. Jelenlegi ismereteink szerint a keményítő  
és polimer emulziók keverékéből álló termékek ugyanolyan  
jóak, mint a korábban alkalmazott termékek az erózió- és ké-  
regcsökkentő hatás tekintetében, de jelentősen olcsóbbak.

### 2.6 Terményvédő termékeknél és trágyáknál történő al- kalmazás

A keményítő felhasználásának egyik területe a ter-  
ményvédő szerként történő alkalmazása a termékek specifikus  
tulajdonságainak megváltoztatása érdekében. A keményítő a  
terményvédő szerek és trágyák nedvesedő képességének foko-  
zására alkalmazható, az aktív alkotórészek ellenőrzött fel-  
szabadulására, a folyékony, illó és/vagy rossz szagú aktív  
alkotórészeknek mikrokristályos, stabil, formálható anya-  
gokká történő átalakítására, egymással össze nem férő ve-  
gyületek elegyítésére és a hatás időtartamának a lebomlás  
csökkentésével történő meghosszabbítására alkalmazható.

### 2.7 Gyógyászati, orvosi és kozmetikai ipar

A felhasználás egy másik területe a gyógyászati, or-  
vosi és kozmetikai ipar. A gyógyászati iparban a keményítő  
tabletták kötőanyagaként vagy a kapszulákban lévő kötőanyag  
hígítására alkalmazható. A keményítő ezenkívül tablettá  
diszintegránsként is alkalmazható, mivel lenyelés után fo-



lyadékot szív magába és rövid időn belül oly mértékben megdagad, hogy az aktív alkotórész felszabadul. Az orvosi síkosító porok vagy sebhintőporok minőségi okokból keményítő alapúak. Kozmetikai területen a keményítőt például por alakú adalékanyagok, például illatanyagok és szalicilsav, hordozójaként alkalmazzák. A keményítő felhasználásának egyik viszonylag nagy területe a fogkrémek gyártása.

#### 2.8 Keményítőnek szénhez és briketthez történő adagolása

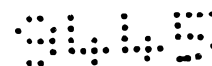
A keményítő felhasználásának egyik területe a szénhez és brikettekhez adalékanyagként történő alkalmazása. Keményítő hozzáadásával a szénből nagy mennyiségben agglomerátum vagy brikett képezhető, ami megakadályozza a brikett idő előtti szétesését. Grillszén esetében a hozzáadagolt keményítő mennyisége eléri a 4-6%-ot, nagy energiájú szén esetében a 0,1-0,5%-ot. A keményítőnek kötőanyagként történő alkalmazása egyre nagyobb jelentőségre tesz szert, mivel a káros anyagok kibocsátása jelentősen csökkenthető keményítőnek a szénhez vagy briketthez történő hozzáadásával.

#### 2.9 Érciszap és széniszap feldolgozása

A keményítő ülepítőszerként alkalmazható az érciszap és széniszap feldolgozása területén.

#### 2.10 Öntődei segédanyag

Az adalékanyagként történő felhasználásának egy további területe az öntődei segédanyagként történő alkalmazása. Számos öntési folyamatnál szükség van kötőanyagokkal kezelt homokból készített magra. Kötőanyagként manapság elsősorban bentonitot alkalmaznak, amelyet módosított kemé-



nyítóvel kezelnek, túlnyomórészt duzzadásra képes keményítőkkel.

A keményítő hozzáadása a folyékonyság növelését és a kötési erő fokozását szolgálja. A duzzadásra képes keményítő a termék kialakítása során előálló egyéb követelményeknek is eleget tesz, például hideg vízzel elkeverhető, hidratálható, homokkal elegyedik és nagy vízkötő képességgel bír.

#### 2.11 Gumiiparban történő alkalmazás

A gumiiparban a keményítőt a technikai és vizuális minőség javítására, a felület fényességének fokozására, a tapintás és a megjelenés javítására alkalmazzák, és e célból hintenek szét keményítőt a gumi még ragacsos felületén a hideg vulkanizálás előtt, valamint a gumi nyomásállóságának fokozása érdekében.

#### 2.12 Bőrhelyettesítők előállítása

Módosított keményítők bőrhelyettesítők termelésére is eladhatók.

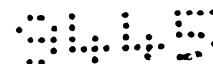
#### 2.13 Keményítő a szintetikus polimerekben

A polimerek területén a következő területeket kell áttekinteni: a keményítő bomlástermékek alkalmazása a feldolgozási folyamatban (a keményítő csak töltőanyagként szolgál, nincs közvetlen kötés a polimer és a keményítő között), vagy egy másik lehetőség a keményítő bomlástermékek alkalmazása a polimerek gyártásában (a keményítő és a polimer egy stabil kötést képez).



A keményítőnek csupán töltőanyagként történő alkalmazása nem jelent konkurenciát más anyagok számára, például talkum számára. Az azonban más, amikor a keményítő specifikus tulajdonságai hatást gyakorolnak, és így jelentősen megváltoztatják a végtermék jellemzőinek körét. Erre egy példa a keményítőtermékeknek a hőre lágyuló műanyagok, például a polietilén feldolgozásában történő alkalmazása. Ebben az esetben a keményítőt és a szintetikus polimert összesajtolással 1:1 arányban egyesítik, ami egy nyers masszát eredményez, amelyből granulált polietilénnel különböző termékek alakíthatók ki a hagyományos technológiákkal. A keményítőnek polietilén filmekben történő alkalmazásával üreges testekben magasabb fokú permeabilitás, vízpárával szemben fokozottabb permeabilitás, jobb antisztatikus viselkedés érhető el, kevésbé alakul ki akadály és vizes tintával jobban nyomtatható.

Egy másik lehetőség a keményítőnek poliuretán haboknál történő alkalmazása. Keményítőszármazékok megfelelő alkalmazásával és a folyamatmérnöki optimalizálással irányított módon szabályozható a szintetikus polimerek és a keményítő hidroxil-csoportjai közötti reakció. Ez egy olyan poliuretán filmet eredményez, amelynek a keményítőnek köszönhetően a következők a jellemzői: csökkent hőtágulási koeficiens, csökkent összehúzódási viselkedés, jobb nyomásfeszülési viselkedés, vízpárával szemben fokozottan átjárható anélkül, hogy a vízfelvétel megváltozna, csökkent gyulladásképesség és csökkent végső húzószilárdság, az éghető részek nem képeznek cseppeket, halogénektől mentes és



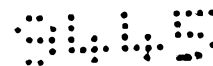
lassabb az elhasználódás. A még meglévő hátrányok a gyengébb nyomtathatóság és ütésállóság.

A termékfejlesztés jelenleg már nem csak a filmekre korlátozódik. Ötven százaléknál nagyobb keményítőtartalmú szilárd polimertermékek, például virágcserepek, lapok és edények is előállíthatók. A keményítő/polimer keverékek azért is előnyösebbek, mivel a biológiai lebonthatóságuk sokkal jobb.

A keményítővel oltott polimerek rendkívül nagy vízmegkötő kapacitásuk miatt váltak igen fontossá. Ezek a termékek egy keményítőből álló vázból és egy szintetikus monomer oldalirányú szövetéből állnak, amely a szabad gyök láncmechanizmusának elvét követve oltódik be. A jelenleg hozzáférhető, keményítővel oltott polimerek jobb vízkötő és -megtartó képességükkel tűnnek ki - a keményítő egy grammjára vonatkoztatva akár 1000 g vizet is meg tud kötni - amely erős viszkozitással párosul. Ezeknek a kiváló abszorbeánsoknak a felhasználási területe az utóbbi években jelentősen szélesedik, és ilyen termékek higiéniai területen, például pelenkáknál és egészségügyi betéteknél, és mezőgazdasági területen, például magbevonóknál alkalmazhatók.

Az új, genetikailag módosított keményítők felhasználásánál döntő fontosságú egyrészt a szerkezet, a víztartalom, a fehérjetartalom, a lipidtartalom, a rosttartalom, a hamu/foszfát tartalom, az amilóz/amilopektin arány, a molekulatömeg-eloszlás, az elágazás mértéke, a szemcse méret és szemcsealak és a kristályosság, másrészt pedig azok a jellemzők, amelyek a következő tulajdonságokat





befolyásolják: áramlási és elnyelési viselkedés, zselatinosodási hőmérséklet, viszkozitás, a viszkozitás stabilizálása sóoldatokban, sűrítőképeség, oldhatóság, gél szerkezet és a gél átlátszósága, hőstabilitás, nyírési stabilitás, savállóság, degenerálódásra való hajlam, gélképzés, fagyasztási-olvasztási stabilitás, komplexképzés, jódkötés, filmképzés, kötőerő, enzimstabilitás, emészthetőség és reaktivitás.

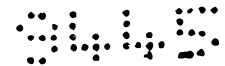
A módosított keményítők rekombináns módszerrel történő előállítására egyrészről megváltoztatja a növényből származó keményítő tulajdonságait oly módon, hogy további módosítások kémiai vagy fizikai eszközökkel már nem szükségesek. Másrészről a rekombináns eljárásokkal megváltoztatott keményítőkön további kémiai módosítások végezhetők, amelyek további minőségi javulást eredményeznek néhány, az előzőekben ismertetett felhasználási területen. Ezek a kémiai módosítások általában ismertek. Ilyenek például a hőkezelés, a szerves vagy szervetlen savakkal történő kezelések, az oxidáció és az észterezés útján történő módosítások, amelyek például foszfátkeményítők, nitrátkeményítők, szulfátkeményítők, xantátkeményítők, acetátkeményítők és citrátkeményítők kialakulását eredményezik. Egy- vagy többértékű alkoholok erős savak jelenlétében keményítőéterek előállítására alkalmazhatók, amely keményítő-alkil-éterek, O-allil-éterek, hidroxil-alkil-éterek, O-karboxi-metil-éterek, nitrogéntartalmú keményítőéterek, foszfáttartalmú keményítőéterek, kéntartalmú keményítőéterek, keresztkötéses kemé-

nyítók vagy keményítővel oltott polimerek kialakulásához vezet.

A találmány szerinti keményítők egy előnyös alkalmazása egyrészt a csomagolóanyagok és az eldobható termékek előállítása, valamint másrészt az élelmiszerek vagy élelmiszer-nyersanyagok előállítása.

A találmány szerinti nukleinsavaknak növényi sejtekben szensz vagy antiszensz orientációban történő expresszállása érdekében a nukleinsavak a növényi sejtekben történő transzkripció biztosítására szolgáló szabályozó elemekhez kapcsolhatók. Ilyenek például előnyösen a promóterek, a serkentők és a terminátorok. Általában bármilyen, növényi sejtekben aktív promóter alkalmazható az expresszióra.

A promóterek oly módon választhatók, hogy konstitutív módon, vagy csak egy bizonyos szövetben, a növényi fejlődés egy bizonyos időpontjában vagy külső tényezők által meghatározott, egy bizonyos időpontban történjen az expresszió. A növényhez képest a promóter homológ vagy heterológ lehet. Alkalmas promóterek például a karfiol mozaikvírus 35S-RNS-promóter és kukorica ubiquitin-promóter konstitutív expresszióhoz, a patatin B33-promóter [Rocha-Sosa és mtsai., EMBO J. 8, 23-29 (1989)] gumóspecifikus expresszióhoz, vagy egy olyan promóter, amely csak fotoszintetikusán aktív szövetekben biztosítja az expressziót, például az ST-LS1-promóter [Stockhaus és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7943-7947 (1987); Stockhaus és mtsai., EMBO J. 8, 2445-2451 (1989)], vagy pedig

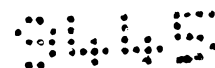


endospermiumra specifikus expresszióhoz a búza AMG-promóter, az USP-promóter, a phaseolin-promóter vagy kukorica zein génjeiből származó promóterek.

Terminációs szekvenciák szintén jelen lehetnek, amelyek a transzkripció megfelelő befejeződését biztosítják és a transzkriptumhoz egy poli-A-véget kapcsolnak, amelynek funkciója feltehetőleg a transzkriptumok stabilizálása. Ilyen elemek leírása az irodalomban megtalálható [lásd, Gielen és mtsai., EMBO J. 8, 23-29 (1989)], és kívánság szerint cserélhetők.

A találmány tárgyát képezik búzaeredetű, izoamiláz funkciójú fehérjét kódoló nukleinsavmolekulák. A találmány szerinti nukleinsavmolekulák lehetővé teszik ennek az enzimnek az előállítását, a keményítő bioszintézisében való funkciójának azonosítását, valamint olyan, rekombináns technológiával megváltoztatott növények előállítását, amelyekben ennek az enzimnek az aktivitása megváltozott, és így a növényekben oly módon megváltozott keményítő szintetizálódik, amelynek szerkezete és fizikai-kémiai tulajdonsága megváltozott.

Elvileg a találmány szerinti nukleinsavmolekulák olyan növények előállítására is alkalmazhatók, amelyekben a találmány szerinti izoamiláz aktivitása fokozódott vagy csökkent, míg ezzel egy időben a keményítő szintézisében szerepet játszó, más enzimek aktivitása megváltozik. A növényekben az izoamiláz aktivitásának megváltozása megváltozott szerkezetű keményítő szintézisét eredményezi. Egy izoamilázt vagy alkalmas antiszensz konstrukciókat kódoló



nukleinsavmolekulák továbbá olyan növényi sejtekbe vihetők, amelyekben az endogén keményítő-szintázok vagy elágazást kialakító enzimek szintézise már gátolva van [lásd pl., WO 92/14827 számú nemzetközi közzétételi irat vagy Shannon és Garwood, Starch: Chemistry and Technology, 2. kiad., 25-86 szerk.: Whistler, BeMiller és Paschall, kiad.: Academic Press, London (1984)].

Kívánt esetben a transzformált növényekben a keményítő bioszintézisében szerepet játszó számos enzim szintézisének gátlása érdekében a transzformáció olyan DNS-molekulákkal történik, amelyek egyidejűleg több, a kérdéses enzimeket kódoló szakaszt tartalmaznak antiszensz orientációban egy alkalmas promóter ellenőrzése alatt. Itt is lehetséges, hogy mindegyik szekvencia a saját promótere ellenőrzése alatt álljon, vagy a szekvenciák fúzióként írhatók át egy kapcsolt promóterről, vagy egy kapcsolt promóter ellenőrzése alatt állhatnak. Ez utóbbi lehetőséget általában előnyben részesítik, mivel ebben az esetben a kérdéses fehérjék szintézisét nagyjából azonos mértékben kell gátolni. Ami az ilyen konstrukcióban alkalmazott, egyedi, kódoló szakaszok hosszát illeti, az előzőekben, az antiszensz konstrukciók előállításával kapcsolatban ismertetettek itt is érvényesek. Elvileg nincs felső határa az egy ilyen DNS-molekulában lévő antiszensz fragmenseknek, hogy egyetlen promóterről indulva átíródjanak. A képződő transzkriptumnak azonban előnyösen kisebbnek kell lennie 10 kb-nál, előnyösen 5 kb-nál.

Az ilyen DNS-molekulákban elhelyezkedő kódoló szakaszok más, antiszensz orientációban lévő kódoló szakaszokkal együtt egy alkalmas promóter mögött olyan DNS-szekvenciákból származhatnak, amelyek a következő fehérjéket kódolják: szemcséhez kötött keményítő-szintázokat (GBSS I és II, "granule-bound starch synthase") és oldható keményítő-szintázokat (SSS I és II, "soluble starch synthases"), elágazásokat kialakító enzimeket (izoamilázok, pullulanázok, R-enzimek, elágazásokat kialakító enzimek és elágazásokat bontó enzimek), keményítő-foszforilázokat és diszproporcionáló enzimeket. Ez a felsorolás csak például szolgál. Más DNS-szekvenciák is alkalmazhatók ilyen kombinációk kialakításának céljára.

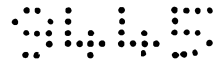
Ilyen konstrukciók sokféle enzim szintézisének egyidejű gátlását teszik lehetővé az ezekkel a konstrukciókkal transzformált növényi sejtekben.

A konstrukciók olyan növénymutánsokba is bejuttathatók, amelyek sérültek egy vagy több, a keményítő bioszintézisében részt vevő génben [Shannon és Garwood, Starch: Chemistry and Technology, 2. kiad., 25-86 szerk.: Whistler, BeMiller és Paschall, kiad.: Academic Press, London (1984)]. Ezek a sérülések a következő fehérjékhez kapcsolódhatnak: szemcséhez kötött keményítő-szintázok (GBSS I és II), oldható keményítő-szintázok (SSS I és II), elágazásokat kialakító enzimek (BE I és II, "branching enzyme"), elágazásokat bontó enzimek (R-enzimek), diszproporcionáló enzimek és keményítő-foszforilázok. Ez a felsorolás csak például szolgál.

Ez a módszer sokféle enzim szintézisének egyidejű gátlását teszi lehetővé az ezekkel a konstrukciókkal transzformált növényi sejtekben.

Idegen géneknek magasabbrendű növényekbe történő bevitelére számos klónozó vektor áll rendelkezésre, amelyek egy *E. coli* replikációs szignált és egy, a transzformált bakteriális sejtek kiválogatására szolgáló markergént tartalmaznak. Ilyen vektorok például a pBR322, a pUC-sorozatok, az M13mp-sorozatok, a pACYC184 és hasonlóak. A kívánt szekvencia a vektorba egy megfelelő restriktációs hasítási helybe építhető be. Az így nyert plazmidot alkalmazzuk *E. coli* sejtek transzformálására. A transzformált *E. coli* sejteket alkalmas tápközegen szaporítjuk, majd ezt követően összegyűjtjük és lizáljuk. A plazmidot kinyerjük. A kinyert plazmid-DNS jellemzésére általánosan alkalmazott eljárások a restriktációs analízisek, a gélelektroforézis és egyéb biokémiai és molekuláris biológiai eljárások. Minden egyes manipuláció után a plazmid-DNS hasítható és a képződő DNS-fragmens más DNS-szekvenciákhoz kapcsolható. Mindegyik plazmid-DNS-szekvencia azonos vagy eltérő plazmidokba klónozható.

Sokféle technológia áll rendelkezésre egy növényi gazdasejtbe a DNS bejuttatására. Ilyen technológiák például a növényi sejtek t-DNS-sel történő transzformációja transzformációs eszközként *Agrobacterium tumefaciens* vagy *Agrobacterium rhizogenes* alkalmazásával, a protoplaszt-fúzió, az injektálás, a DNS elektroporációja, a DNS bio-

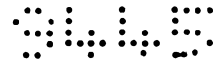


lisztikus módszerrel történő bevitele, és hasonló lehetőségek.

A DNS-nek injektálással vagy elektroporációval történő bejuttatása a növényi sejtekbe önmagában nem kíván különösebb megfontolásokat az alkalmazott plazmiddal szemben. Egyszerű plazmidok, például pUC-származékok alkalmazhatók. Azonban ha ép növényeket kívánunk regenerálni az ilyen, transzformált sejtekből, általában egy szelekciós markergén jelenléte is szükséges.

A kívánt génnek a növényi sejtbe történő bejuttatására alkalmazott eljárástól függően további DNS-szekvenciák is szükségesek lehetnek. Ha például Ti- vagy Ri-plazmidokat alkalmazunk a növényi sejtek transzformálására, a T-DNS Ti- és Ri-plazmidjának legalább a jobb oldali, de gyakran a jobb és bal oldali határainak is kapcsolódnia kell szegélyező szakaszokként a bejuttatandó génnel.

Ha agrobaktériumokat alkalmazunk a transzformációhoz, a bejuttatandó DNS-t specifikus plazmidokba kell klónozni, vagy egy közvetítő vektorba vagy egy bináris vektorba. A közvetítő vektor az *Agrobacterium* Ti- vagy Ri-plazmidjába homológ rekombinációval építhető be a T-DNS-ben lévő szekvenciákkal homológ szekvenciáknak köszönhetően. A közvetítő vektor tartalmazza a *vir*-szakaszt is, amely a T-DNS átviteléhez szükséges. A közvetítő vektorok *Agrobacterium*ban nem tudnak szaporodni. A közvetítő vektor *Agrobacterium tumefaciens*be egy "helper", segítő plazmid segítségével, konjugációval vihető át. A bináris vektorok *E. coli*ban és *Agrobacterium*ban is képesek szaporodni. Egy szelekciós gént



is tartalmaznak és egy linkert vagy polilinkert, amelyeket a bal és jobb oldali T-DNS határszakaszok szegélyeznek. Ezek közvetlenül transzformálhatók *Agrobacterium*ba [Holster és mtsai., Mol. Gen. Genet. 163, 181-187 (1978)] A gazda-sejtként funkcionáló *Agrobacterium*nak hordoznia kell egy vir-szakaszt tartalmazó plazmidot. A vir-szakasz a T-DNS-nek a növényi sejtbe történő bejutásához szükséges. Egyéb T-DNS is jelen lehet. Az ilyen módon transzformált *Agrobacterium* növényi sejtek transzformálására alkalmazható.

A T-DNS alkalmazását növényi sejtek transzformálására intenzíven kutatják és leírása megtalálható a következő publikációkban: EP 120516; Hoekema, "The Binary Plant Vector System", 5. fejezet, Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasserdam (1985); Fraley és mtsai., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 és An és mtsai., EMBO J. 4, 277-287 (1985)].

A DNS-nek a növényi sejtbe történő bejuttatása érdekében növényi explantátumokat *Agrobacterium tumefaciens* vagy *Agrobacterium rhizogenes* sejtekkel együtt tenyésztünk. A fertőzött növényi anyagból (pl., levéldarabokból, szárdarabokból, gyökérből, vagy akár protoplasztokból vagy szuszpenziós tenyészetben szaporodó növényi sejtekből) ép növények regenerálhatók egy alkalmas tápközegen, amely többek között bizonyos cukrokat, aminosavakat, antibiotikumokat vagy biocidokat tartalmaz a transzformált sejtek kiválogatása érdekében. A képződő növényekben a bevitt DNS megléte vizsgálható. Más lehetőségek is ismeretesek idegen DNS bejuttatására, például biolisztikus eljárás vagy protoplaszt-





transzformáció alkalmazása [lásd pl., Willmitzer, L., "Transgenic plants", Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise, 2. kötet, 627-659 szerk.: Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P., VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge (1993)].

A kétszikű növények Ti-plazmid-vektorrendszerrel történő transzformációja *Agrobacterium tumefaciens* segítségével alaposan kidolgozott, a legújabban megjelent közlemények szerint azonban akár egyszikű növények transzformációja is elvégezhető *Agrobacterium* alapú vektorokkal [Chan és mtsai., Plant Mol. Biol. 22, 491-506 (1993); Hiei és mtsai., Plant J. 6, 271-282 (1994)].

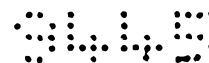
Más lehetőségek az egyszikű növények transzformációjára a biolisztikus módszer segítségével történő transzformáció, a protoplaszt-transzformáció vagy a protoplasztok fizikai vagy kémiai úton kiváltott DNS-felvétele, például a részlegesen permeabilizált sejtek elektroporációja, az üvegszál segítségével történő DNS-átvitel, a DNS makroinjektálása a virágzatba, a DNS mikroinjektálása a mikropórákba vagy a proembriókba, a DNS-felvétel a csírázó pollennel és az embriók DNS-felvétele duzzadással [áttekintés: Potrykus, Physiol. Plant 269-273 (1990)].

Az előzőekben említett transzformációs rendszer közül hármat: a szövet elektroporációját, a protoplasztok transzformációját és a regenerálható szövetbe vagy sejtekbe részecekbombázás útján történő DNS-átvitelt különböző gabonafélékre már kidolgozták [áttekintés: Jähne és mtsai., Euphytica 85, 35-44 (1995)].



Búza transzformálására különböző eljárásokat írtak le az irodalomban [áttekintés: Maheshwari és mtsai., *Critical Reviews in Plant Science* 14(2), 149-178 (1995)], Hess és munkatársai [*Plant Sci.* 72, 233 (1990)] makroinjekciós eljárást alkalmaznak a pollen és az agrobaktériumok egymás közelségébe hozására. Az nptII-gént, mint szelekciós markert hordozó plazmid mozgását Southern-blot vizsgálattal és NPTII-vizsgálattal mutatták ki. A transzformánsok normális fenotípust mutattak és termékenyek voltak. Kanamicin-rezisztenciát két egymást követő generációban mutattak ki.

A kirepített mikrorészecskékhez kötött DNS-sel történő bombázás után regenerált, első, termékeny, transzgénikus búzanövényről Vasil és munkatársai számoltak be [*Bio/Technology* 10, 667-674 (1992)]. A bombázás célszövege embriogén kalluszkultúra volt (C-típusú kallusz). Az alkalmazott szelekciós marker a bar-gén volt, amely foszfinotricin-aciltranszferázt kódol és így rezisztenciát biztosít a foszfinotricin gyomirtó szerre. Week és munkatársai [*Plant Physiol.* 102, 1077-1084 (1993)] és Becker és munkatársai [*Plant J.* 5(2), 299-307 (1994)] egy másik rendszert ismertettek. Ennél a DNS-transzformáció célszövege az éretlen embrió sziklevele volt, amelyet egy előzetes *in vitro* szakaszban szomatikus embriók képzésére indukáltak. A Becker és munkatársai (lásd fent) által kifejlesztett rendszerben a transzformációs hatékonyság 1 transzgénikus növény 83, "Florida" változatú embrió közül, amely lényegesen nagyobb a Weeks és munkatársai rendszerével elérhető



transzformációs gyakoriságnál, amely 1-2 transzgénikus növény 1000, "Bohnwhite" változatú embrió közül.

A Becker és munkatársai (lásd fent) kifejlesztette rendszer szolgál alapul a példákban ismertetett transzformációs kísérletekhez.

Amint a bejuttatott DNS a növényi sejt genomjába integrálódik, rendszerint stabil marad és az eredeti, transzformált sejt utódaiban megmarad. Általában tartalmazza az előzőekben ismertetett szelekciós markerek egyikét, amely a transzformált növényi sejteknek például rezisztenciát biztosít egy gyomirtó szerre, például foszfinotricinre, vagy egy antibiotikumra, például kanamicinre, G418-ra, bleomicinre vagy higromicinre, vagy amely szelekciót tesz lehetővé bizonyos cukrok vagy aminosavak jelenlétének vagy hiányának alapján. Az egyedi esetben választott marker lehetővé teszi tehát a transzformált sejtek kiválogatását a bejuttatott DNS-t nem tartalmazó sejtek közül.

A növényen belül a transzformált sejtek a szokásos módon szaporodnak [lásd, McCormick és mtsai., Plant Cell Reports 5, 81-84 (1986)]. A képződő növények normálisan fejlődnek és hibridizálnak olyan növényekkel, amelyeknek ugyanolyan transzformált vagy másmilyen csíraplazmájuk van. A képződő hibridegyedeknek ennek megfelelő fenotípusos tulajdonságaik vannak. A növényi sejtekből magok nyerhetők. Két vagy több generációt kell felnevelni ahhoz, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a fenotípusos jellemvonás stabilan megmarad és öröklődik. A magokat be kell gyűjteni ahhoz,



hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a kérdéses fenotípus vagy más jellemvonás megmaradt.

A következő példák csak szemléltetik a találmányt és semmiképpen sem korlátozzák.

### 1. Klónozási eljárások

*E. coli*ba történő klónozáshoz a pBluescript II SK jelű vektort (Stratagene) alkalmaztuk.

### 2. Baktériumtörzsek

*E. coli* DH5 $\alpha$  törzsét (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) alkalmaztuk a pBluescript vektorhoz és az antiszensz konstrukciókhoz. Az *E. coli* XL1-Blue törzset alkalmaztuk az *in vivo* kivágáshoz.

### 3. Az éretlen búzaembriók transzformálása

Tápközegek:

MS: 100 ml/l makrosók

1 ml/l mikrosók

2 ml/l vas/nátrium-EDTA

30 g/l szacharóz

[Becker, D. és Lörz, H., Plant Tissue Culture Manual B12, 1-20 (1996)]

#30: MS + 2,4-D (2 mg/l)

#31: MS + 2,4-D (2 mg/l) + foszfinotricin (PPT, a BASTA gyomirtó szer aktív komponense) (2 mg/l)

#32: MS + 2,4-D (0,1 mg/l) + PPT (2 mg/l)

#39: MS + 2,4-D (2 mg/l) + 0,5 N mannit/0,5 N szorbit

A feltüntetett tápközegeket pH 5,6-ra állítjuk kálium-hidroxiddal és 0,3 % Gelrite-tel szilárdítjuk.

Az éretlen búzaembriók transzformálására szolgáló eljárást Becker és Lörz [Becker, D. és Lörz, H., Plant Tissue Culture Manual B12, 1-20 (1996)] fejlesztette ki és optimalizálta.

Az alábbiakban ismertetett kísérletekben a Becker és Lörz (lásd fent) által kifejlesztett eljáráshoz ragaszkodtunk.

A transzformációhoz a búzakalászatokat a szemtermésekkel a beporzás utáni 12-14 napos fejlődési állapotban begyűjtöttük és a felületüket sterilizáltuk. Az izolált szikleveleket #30 jelű indukciós tápközegre helyeztük hipokotillal a tápközeg felé.

Kettő-négy napos előtenyésztést követően (26°C, sötétben) az explantátumokat #39 jelű tápközegre helyeztük át az ozmotikus előtenyésztés érdekében (2-4 óra, 26°C, sötétben).

A biolisztikus transzformációhoz egy lövésnél körülbelül 29 µg aranyrészecskét alkalmaztunk, amelyre előzőleg néhány µg cél-DNS-t csapattunk rá. Mivel a végrehajtott kísérletek kotranszformációiak, a célgén és egy rezisztencia markergén (bar-gén) 1:1 arányú keverékéből álló cél-DNS-t adtuk a kicsapó oldathoz.

#### 4. A DNS-fragmensek DIG jelölése

A szűrővizsgálati próbaként alkalmazott DNS-fragmenseket egy specifikus PCR-rel jelöltük, DIG-gel jelölt dUTP (Boehringer Mannheim, Germany) beépülésével.

A példákban alkalmazott tápközegek és oldatok:

20 X SSC: 175,3 g nátrium-klorid

88,2 g nátrium-citrát

bidesztillált vízzel 1000 ml-re töltve

pH 7,0 10 N nátrium-hidroxiddal

A pTaSU8A-plazmidot a DSMZ-nél Braunschweigban, Német Szövetségi Köztársaság, letétbe helyeztük a Budapesti Szerződés értelmében DSM 12795 számon, valamint a pTaSU19-plazmidot DSM 12796 számon.

#### 1. példa

Búzából (*Triticum aestivum* L., cv Florida) származó izoamilázt kódoló cDNS azonosítása, izolálása és jellemzése

Búza izoamiláz izoformát ("sugary") kódoló cDNS azonosítása érdekében heterológ szűrővizsgálati stratégiát követünk. Ennek során búza cDNS-könyvtárat egy kukorica eredetű "sugary" próbával szűrtünk.

A próbát ("sugary" próba) kukorica cDNS-könyvtárból izoláltuk specifikus láncindítók segítségével PCR-amplifikációval. A kukorica cDNS-könyvtárat a beporzás után 13, 17, 19, 20, 22, 25 és 28 napos (DAP) szemtermések egyforma arányú keverékéből származó, Lambda Zap II vektorban lévő poli(A)+RNS-ből klónoztuk a gyártó útmutatásai szerint (Lambda Zap II-cDNS Synthesis Kit Stratagene GmbH, Heidelberg, Germany). Minden alkalmazott szemtermésből, a 13 napos magok kivételével, eltávolítottuk az embriót az RNS-izolálást megelőzően.

A búza cDNS-könyvtár szűrővizsgálatára próbaként alkalmazott DNS-fragmenst a következő láncindítók alkalmazásával amplifikáltuk:

sulp-1: 5'AAAGGCCCAATATTATCCTTTAGG3' (4. azonosítószámú szekvencia)

sulp-2: 5'GCCATTTCAACCGTTCTGAAGTCGGGAAGTC3' (5. azonosítószámú szekvencia)

A PCR-reakcióhoz alkalmazott templát az amplifikált kukorica eredetű cDNS-könyvtár 2 µl-e volt. A PCR-reakció ezen kívül 1,5-3 mmol magnézium-kloridot, 20 mmol Tris-HCl-t (pH 8,4), 50 mmol kálium-kloridot, 0,8 mmol dNTP-keveréket, 1 µmol sulp-1a-láncindítót, 1 µmol sulp-2-láncindítót és 2,5 egység Taq-polimerázt (rekombináns, Life Technologies) tartalmazott.

Az amplifikációt Trioblockban végeztük (Biometra) a következő beállítással: 4 min/95°C; 1 min/95°C, 45 sec/58°C; 1 min 15 sec/72°C; 30 ciklus 5 min/72°C. Az amplifikált, körülbelül 990 bp nagyságú DNS-sávot agaróz gélben elválasztottuk és kivágtuk. Egy második amplifikációt [hiány] ebből a fragmensből az előzőekben ismertetett felállítással. Az ebből a második amplifikációból nyert 990 bp fragmenst *Bam*HI restrikciós enzimmal hasítottuk egy 220 bp és egy 770 bp nagyságú fragmensre. Miután a "sugary" fragmenst agaróz gélben elválasztottuk, a sávot kivágtuk, a fragmenst izoláltuk, és a próbát DIG-gel jelöltük. Ötszáz ng "sugary" fragmenst alkalmaztunk a digoxigeninnel történő véletlenszerű láncindító-jelöléshez. Tíz mikroliter véletlenszerűen kiválasztott láncindítót adtunk a jelölendő fragmenshez és

a reakcióelegyet 5 percen keresztül 95-100°C-ra melegítettük. A felmelegítés után 0,1 mmol dATP-t, 0,1 mmol dGTP-t, 0,1 mmol dCTP-t és 0,065 mmol dTTP-t, 0,035 mmol digoxigenin-11-dUTP-t (Boehringer Mannheim), Klenow-puffert (hagyományos) és 1 egység Klenow-polimerázt adtunk a reakcióelegyhez. A reakciót egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten végeztük. A jelölés ellenőrzésére egy dot-vizsgálatot hajtottunk végre a gyártó útmutatásai alapján ("The DIG System User's Guide for Filter Hybridization", Boehringer Mannheim, Germany).

A búza cDNS-könyvtárat Lambda Zap II vektorban lévő, körülbelül 21 napos ("starchy" endospermium) szemtermések poli(A)+RNS-ből szintetizáltuk a gyártó útmutatásai szerint (Lambda Zap II-cDNS Synthesis Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg). A cDNS-könyvtár titerének meghatározása  $1,26 \times 10^6$  plakképző egység/ml elsődleges titert eredményezett.

A búza cDNS-könyvtárának szűrővizsgálatára körülbelül 350000 fagot terítettünk. A fágokat terítettük és a hagyományos módszerek szerint blottot készítettünk róluk. A filtereket előhibridizáltuk, majd 5X SSC, 3% blokkoló (Boehringer, Mannheim), 0,2% SDS, 0,1% nátrium-laurilzarkozil és 50 µg/ml hering sperma DNS tartalmú oldatban hibridizáltuk 55°C-on. A jelölt "sugary" próbát 1 ng/ml koncentrációban adtuk a hibridizációs oldathoz és egy éjszakán keresztül hibridizáltuk. A filtereket 2 x 5 percig mostuk 2 x SSC-ben, 1% SDS-ben szobahőmérsékleten; 2 x 10 percig 1 x SSC-ben, 0,5% SDS-ben 55°C-on; 2 x 10 percig 0,5 x SSC-ben, 0,2% SDS-ben 55°C-on. A pozitív klónokat további





szűrővizsgálati ciklusokkal válogattuk ki. Egyedi klónokat *in vivo* kivágással pBluescript SK fagmidokként kaptuk meg (a módszer azonos a gyártó útmutatásával, Stratagene, Heidelberg, Germany).

Miután a klónokat miniprep módszerrel és a plazmid DNS restrikciós emésztésével vizsgáltuk, a pTaSU19 jelű klónt a DSMZ-nél, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSM 12796 számon letétbe helyeztük, és részletesebben megvizsgáltuk.

## 2. példa

### A pTaSU19-plazmidokban lévő cDNS-inszerciók szekvenciavizsgálata

A pTaSU19-ből plazmid-DNS-t izoláltunk és a cDNS-inszerciók szekvenciáját didezoxinukleotid-eljárással meghatároztuk [Sanger és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467 (1977)].

A TaSU19-klónban lévő inszert 2997 bp nagyságú és egy részleges cDNS. A nukleotidszekvenciáját az 1. azonosítószámú szekvenciában mutatjuk be. A korábban már közzétett szekvenciákkal történő összehasonlítás kimutatta, hogy az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti szekvencia egy kódoló szakaszt tartalmaz, amely homológiát mutat más szervezetekből származó izoamilázokkal.

A szekvenciavizsgálat azt is kimutatta, hogy a cDNS-szekvenciában két intron található a 297-396 helyzetben (1. intron) és az 1618-2144 helyzetben (2. intron). Ha ezeket az intronokat eltávolítjuk, egy olyan fehérjeszekvencia



alakul ki, amely homológiát mutat más szervezetek izomilázainak fehérjeszekvenciájával.

Az 1. azonosítószámú szekvencia szerinti szekvencia kódoló szakaszainak megfelelő aminosavszekvenciát a 3. azonosítószámú szekvenciában mutatjuk be.

### 3. példa

#### A pTa-alpha-SU19 jelű növényi transzformációs vektor előállítás

A TaSU19-cDNS-nek megfelelő antiszensz RNS expresszálása érdekében a pTA-alpha-SU19 jelű növényi transzformációs vektort készítettük el a pUC19 jelű alapplazmidből a pTA-alpha-SU19 plazmid cDNS-inszerciójának ubiquitin-promóter 3'-végéhez antiszensz orientációban történő kapcsolásával. Ez a promóter kukorica *ubiquitin-1* génjének első, át nem íródó exonjából és első intronjából áll [Christensen, A. H. és mtsai., Plant Molecular Biology 19, 675-689 (1992)]. A polilinker részei és a NOS-terminátor a pAct1.cas-plazmidből származnak (CAMBIA, TG0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia). Vektorkonstrukciókat ezzel a terminátorral és pAct1.cas-on alapuló konstrukciókat McElroy és munkatársai ismertetnek [Molecular Breeding 1, 27-37 (1995)]. Az így kialakított vektort pUbi.cas-nak jelöltük.

A vektort a Ta-SU19-klónból egy 2 kb fragmens *Xba*I restrikciós enzimmel történő hasításával klónoztuk. A fragmens végeit Klenow-reakcióval kitöltöttük, és ezt követően a pUbi.cas expressziós vektor *Sma*I klónozó helyébe ligáltuk.



Az így kialakított expressziós vektort Ta-alpha-SU19-nek jelöljük és a fentiekben ismertetettek szerint búza transzformálására alkalmazzuk.

#### 4. példa

Búzából (*Triticum aestivum* L., cv Florida) származó izoamilázt ("sugary-1" homológ) kódoló további cDNS izolálása és jellemzése

Búzaeredetű cDNS-könyvtárat egy "sugary" próbával szűrtünk, amely a pTaSU19-klón egy részét, az 1. azonosítószámú szekvencia 489-1041 nukleotidjait képviseli.

A cDNS-könyvtár szűrővizsgálatára alkalmazott, búzára specifikus, digoxigeninnel jelölt "sugary" próbát PCR-amplifikációval készítettük.

A reakcióban alkalmazott láncindítók a következők voltak:

SUSO1: 5'-GCT TTA CGG GTA CAG GTT CG-3' (8. azonosítószámú szekvencia), és

SUSO2: 5'-AAT TCC CCG TTT GTG AGC-3' (9. azonosítószámú szekvencia)

A reakcióban 1 ng pTaSU19-plazmidot alkalmaztunk templátként. A PCR-reakció továbbá 300-300 nmol SUSO1- és SUSO2-láncindítót, 100-100  $\mu$ mol dATP, dGTP, dCTP nukleotidokat, 65  $\mu$ mol dTTP-t, 35  $\mu$ mol digoxigenin-11-dUTP-t (Boehringer Mannheim), 1,5 mmol magnézium-kloridot, 2,5 egység Taq-polimerázt és 10  $\mu$ l 10-szeresen koncentrált Taq-polimeráz reakciópuffert (mindkettő Life Technologies) tartalmazott. A reakció végtérfogata 100  $\mu$ l. Az amplifikációt PCR-készülékben (TRIO<sup>®</sup> Thermoblock, Biometra) végeztük a



következő hőmérsékleti beállításokkal: 3 min 95°C (egyszer); 45 sec 95°C — 45 sec 55°C — 2 min 72°C (30 ciklus); 5 min 72°C (egyszer). Egy 553 bp nagyságú fragmenst kaptunk. A digoxigenin-11-dUTP-nek a PCR-termékbe történő beépülését az agaróz gélben történő csökkent mobilitással lehetett kimutatni egy digoxigenin-11-dUTP nélküli kontrollreakció termékével összehasonlítva.

Az 1. példa szerinti, szemtermés-specifikus, búzaeredetű cDNS-könyvtárat a képződő, digoxigeninnel jelölt próbával szűrtük.

A hibridizációs lépést egy éjszakán keresztül végeztük 5x SSC, 0,2% SDS, 0,1% nátrium-laurilszarkozil és 50 µg/ml hering sperma DNS tartalmú oldatban 68°C-on 1 ng/ml digoxigeninnel jelölt próbával. A hibridizáció után a filtereket a következők szerint mostuk: 2 x 5 min 2x SSC-ben, 1% SDS-ben szobahőmérsékleten; 2 x 10 min 1x SSC-ben, 0,5% SDS-ben 68°C-on; 2 x 10 min 0,5x SSC-ben, 0,2% SDS-ben 68°C-on. A pozitív klónokat legalább két további szűrővizsgálati ciklus alapján választottuk ki. A pBluescript SK fágklónokból a plazmidokat *in vivo* kivágással nyertük (a gyártó útmutatásai szerint, Stratagene, Heidelberg, Germany). A kinyert klónok restriktációs vizsgálata után a pTaSU8A-klónt a Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen gyűjteményében letétbe helyeztük DSM 12795 számon, és részletesebben vizsgáltuk.

### 5. példa

#### A pTaSU8A-plazmidban lévő cDNS-inszert szekvencia- vizsgálata

A pTaSU8A-plazmidban lévő cDNS-inszert nukleotid-szekvenciáját didezoxinukleotid-eljárással határoztuk meg (6. azonosítószámú szekvencia).

A pTaSU8A-klónban lévő inszerció 2437 bp nagyságú és egy részleges cDNS. A korábban már közzétett szekvenciákkal történő összehasonlítás kimutatta, hogy a 6. azonosítószámú szekvencia szerinti szekvencia egy kódoló szakaszt tartalmaz, amely homológiát mutat más szervezetekből származó izoamilázokkal. Hasonló módon a pTaSU8A-klón kódoló szakaszából származó fehérjeszekvencia, amelyet a 7. azonosítószámú szekvenciában mutatunk be, homológiát mutat más szervezetek izoamilázának fehérjeszekvenciájával. A pTaSU19-klón (1. azonosítószámú szekvencia) és a pTaSU8A-klón (6. azonosítószámú szekvencia) szekvenciáinak összehasonlítása 96,8%-os hasonlóságot mutatott ki. A szekvenciákban a legtöbb eltérés a cDNS-ek 3' át nem íródó szakaszában található. A kódoló szakasz szekvenciáiban lévő többi különbség a következtetett fehérjeszekvenciákban (3. és 7. azonosítószámú szekvenciák) összesen 12 helyen okoz eltérést az aminosavakban. A pTaSU19-ben és a pTaSU8A-ban lévő cDNS-ek nem azonosak és búza izoamiláz izoformáit kódolják.

## 6. példa

### A pTa-alpha-SU8A növényi transzformációs vektor előállítás

A TaSU8A cDNS-ének megfelelő antiszensz RNS expresszálása érdekében a pTA-alpha-SU8A jelű növényi transzformációs vektort készítettük el a pUC19 jelű alapplazmidből a PCR-amplifikációval előállított TASU8A cDNS egy részének ubiquitin-promóter 3'-végéhez antiszensz orientációban történő kapcsolásával. Ez a promóter és a kukorica *ubiquitin-1* génjének első, át nem íródó exonjából és első intronjából áll [Christensen, A. H. és mtsai., *Plant Molecular Biology* 1, 675-689 (1992)]. A polilinker részei és a NOS-terminátor a pAct1.cas-plazmidből származnak (CAMBIA, TG0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia). Vektorkonstrukciókat ezzel a terminátorral és pAct1.cas-on alapuló konstrukciókat McElroy és munkatársai ismertetnek [Molecular Breeding 1, 27-37 (1995)]. A ubiquitin-promótert, a polilinkert és a NOS-terminátort tartalmazó, a pUC19-en alapuló vektort pUbi.cas-nak jelöltük.

A pTa-alpha-SU8A-klónozása érdekében a TaSU8A-cDNS egy körülbelül 2,2 kb fragmensét, azaz a 6. azonosítószámú szekvencia szerinti szekvencia 140-2304 helyzeteit PCR-rel amplifikáltuk.

A reakcióban alkalmazott láncindítók a következők voltak:

SUEX3: 5'-GCG GTA CCT CTA GAA GGA GAT ATA CAT ATG GCG GAG GAC AGG TAC GCG CTC-3' (10. azonosítószámú szekvencia)



SUEX4: 5'-GCT CGA GTC GAC TCA AAC ATC AGG GCG CAA  
TAC-3' (11. azonosítószámú szekvencia).

A reakcióban 1 ng pTaSU8A-plazmidot alkalmaztunk templátként. A PCR-reakció továbbá 300-300 nmol SUEX3- és SUEX4-láncindítót, 200-200  $\mu$ mol dATP, dGTP, dCTP és dTTP nukleotidot, 1,6 mmol magnézium-kloridot, 60 mmol Tris-SO<sub>4</sub>-et (pH 9,1), 18 mmol ammónium-szulfátot és 1  $\mu$ l Elongase<sup>®</sup> enzimkeveréket (Taq-polimeráz és DNS-polimeráz keveréke, Life Technologies) tartalmazott. A reakció végtérfogata 50  $\mu$ l. Az amplifikációt PCR-készülékben (TRIO<sup>®</sup> Thermoblock, Biometra) végeztük a következő hőmérsékleti beállításokkal: 1 min 94°C (egyszer); 30 sec 95°C — 30 sec 55°C — 2 min 30 sec 68°C (30 ciklus); 10 min 68°C (egyszer). A reakció egy 2205 bp nagyságú DNS-fragmenst eredményezett.

A 2,2 kb nagyságú terméket KpnI-gyel és SalI-gyel emésztettük és a KpnI-gyel és SalI-gyel előzetesen emésztett pUbi.cas expressziós vektorba ligáltuk. A képződő növényi transzformációs vektort pTa-alpha-SU8A-nak jelöltük és az előzőekben ismertetettek szerint búza transzformálására alkalmaztuk.



# SZEKVENCIALISTA

(210) 1

(211) 2997

(212) DNS

(213) *Triticum aestivum* L. dv. Florida

(220)

(221) cds

(222) (3) ... (296);

(220)

(221) cds

(222) (397) ... (1617);

(220)

(221) cds

(222) (2145) ... (2960)

(400) 1

gg tgg ggg ccg gcg ccg cgc ctg cga cgg tgg cga ccc aat gcg acg 47  
 Ser Gly Pro Ala Pro Arg Leu Arg Arg Trp Arg Pro Asn Ala Thr  
 1 5 10 15

gcg ggg aag ggg gtc ggc gag gtg tgc gcc gcg gtt gtc gag gcg gcg 95  
 Ala Gly Lys Gly Val Gly Glu Val Cys Ala Ala Val Val Glu Ala Ala  
 20 25 30

acg aag gta gag gac gag ggg gag gag gac gag ccg gtg gcg gag gac 143  
 Thr Lys Val Glu Asp Glu Gly Glu Glu Asp Glu Pro Val Ala Glu Asp  
 35 40 45

agg tac gcg ctc ggc ggc gcg tgc agg gtg ctc gcc gga atg ccc gcg 191  
 Arg Tyr Ala Leu Gly Gly Ala Cys Arg Val Leu Ala Gly Met Pro Ala  
 50 55 60

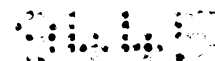
ccg ctg ggc gcc acc gcg ctc gcc ggc ggg gtc aat ttc gcc gtc tat 239  
 Pro Leu Gly Ala Thr Ala Leu Ala Gly Gly Val Asn Phe Ala Val Tyr  
 65 70 75

tcc ggc gga gcc acc gcc gcg gcg ctc tgc ctc ttc acg cca gaa gat 287  
 Ser Gly Gly Ala Thr Ala Ala Ala Leu Cys Leu Phe Thr Pro Glu Asp  
 80 85 90 95

ctc aag gcg gtgggggtgc ctcccgagta gagttcatca gctttgcgtg 336  
 Leu Lys Ala

cgccgcgcgc ccccttttttg ggcctgcaat ttaagttttg tactggggca aatgctgcag 396





|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| gat | agg | gtg | acc | gag | gag | gtt | ccc | ctt | gac | ccc | ctg | atg | aat | egg | acc | 444  |
| Asp | Arg | Val | Thr | Glu | Glu | Val | Pro | Leu | Asp | Pro | Leu | Met | Asn | Arg | Thr |      |
| 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     |      |
| ggg | aac | gtg | tgg | cat | gtc | ttc | atc | gaa | ggc | gag | ctg | cac | aac | atg | ctt | 492  |
| Gly | Asn | Val | Trp | His | Val | Phe | Ile | Glu | Gly | Glu | Leu | His | Asn | Met | Leu |      |
| 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |      |
| tac | ggg | tac | agg | ttc | gac | ggc | acc | ttt | gct | cct | cac | tgc | ggg | cac | tac | 540  |
| Tyr | Gly | Tyr | Arg | Phe | Asp | Gly | Thr | Phe | Ala | Pro | His | Cys | Gly | His | Tyr |      |
|     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |      |
| ctt | gat | gtt | tcc | aat | gtc | gtg | gtg | gat | cct | tat | gct | aag | gca | gtg | ata | 588  |
| Leu | Asp | Val | Ser | Asn | Val | Val | Val | Asp | Pro | Tyr | Ala | Lys | Ala | Val | Ile |      |
|     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |      |
| agc | cga | ggg | gag | tat | ggg | gtt | cca | ggc | ggt | ggt | aac | aat | tgc | tgg | cct | 636  |
| Ser | Arg | Gly | Glu | Tyr | Gly | Val | Pro | Ala | Arg | Gly | Asn | Asn | Cys | Trp | Pro |      |
|     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |     |      |
| cag | atg | gct | ggc | atg | atc | cct | ctt | cca | tat | agc | acg | ttt | gat | tgg | gaa | 684  |
| Gln | Met | Ala | Gly | Met | Ile | Pro | Leu | Pro | Tyr | Ser | Thr | Phe | Asp | Trp | Glu |      |
|     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |     | 190 |     |     |     |      |
| ggc | gac | cta | cct | cta | aga | tat | cct | caa | aag | gac | ctg | gta | ata | tat | gag | 732  |
| Gly | Asp | Leu | Pro | Leu | Arg | Tyr | Pro | Gln | Lys | Asp | Leu | Val | Ile | Tyr | Glu |      |
| 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 210 |      |
| atg | cac | ttg | cgt | gga | ttc | acg | aag | cat | gat | tca | agc | aat | gta | gaa | cat | 780  |
| Met | His | Leu | Arg | Gly | Phe | Thr | Lys | His | Asp | Ser | Ser | Asn | Val | Glu | His |      |
|     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |     |      |
| ccg | ggt | act | ttc | att | gga | gct | gtg | tgc | aag | ctt | gac | tat | ttg | aag | gag | 828  |
| Pro | Gly | Thr | Phe | Ile | Gly | Ala | Val | Ser | Lys | Leu | Asp | Tyr | Leu | Lys | Glu |      |
|     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |     |      |
| ctt | gga | gtt | aat | tgt | att | gaa | tta | atg | ccc | tgc | cat | gag | ttc | aac | gag | 876  |
| Leu | Gly | Val | Asn | Cys | Ile | Glu | Leu | Met | Pro | Cys | His | Glu | Phe | Asn | Glu |      |
|     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |     |      |
| ctg | gag | tac | tca | acc | tct | tct | tcc | aag | atg | aac | ttt | tgg | gga | tat | tct | 924  |
| Leu | Glu | Tyr | Ser | Thr | Ser | Ser | Ser | Lys | Met | Asn | Phe | Trp | Gly | Tyr | Ser |      |
|     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |     |      |
| acc | ata | aac | ttc | ttt | tca | cca | atg | aca | aga | tac | aca | tca | ggc | ggg | ata | 972  |
| Thr | Ile | Asn | Phe | Phe | Ser | Pro | Met | Thr | Arg | Tyr | Thr | Ser | Gly | Gly | Ile |      |
|     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     | 290 |      |
| aaa | aac | tgt | ggg | cgt | gat | gcc | ata | aat | gag | ttc | aaa | act | ttt | gta | aga | 1020 |
| Lys | Asn | Cys | Gly | Arg | Asp | Ala | Ile | Asn | Glu | Phe | Lys | Thr | Phe | Val | Arg |      |
|     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     | 305 |     |      |
| gag | gct | cac | aaa | cgg | gga | att | gag | gtg | atc | ctg | gat | gtt | gtc | ttc | aac | 1068 |
| Glu | Ala | His | Lys | Arg | Gly | Ile | Glu | Val | Ile | Leu | Asp | Val | Val | Phe | Asn |      |
|     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |     |      |
| cat | aca | gct | gag | ggg | aat | gag | aat | ggg | cca | ata | tta | tca | ttt | aag | ggg | 1116 |
| His | Thr | Ala | Glu | Gly | Asn | Glu | Asn | Gly | Pro | Ile | Leu | Ser | Phe | Lys | Gly |      |
|     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |     |      |
| gtc | gat | aat | act | aca | tac | tat | atg | ctt | gca | ccc | aag | gga | gag | ttt | tat | 1164 |

|                                                                     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
|---------------------------------------------------------------------|------|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|-----|--|--|
| Val<br>340                                                          | Asn  | Thr | Thr | Tyr | Tyr<br>345 | Met | Leu | Ala | Pro | Lys<br>350 | Gly | Glu | Phe | Tyr |  |  |
| aac tat tct ggc tgt qgg aat acc ttc aac tgt aat cat cct gtg gtt     | 1212 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn His Pro Val Val     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| 355                                                                 | 360  | 365 | 370 |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| cgt caa ttc att gta gat tgt tta aga tac tgg gtg acg gaa atg cat     | 1260 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val Thr Glu Met His     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
|                                                                     | 375  |     |     |     |            |     |     | 380 |     |            |     |     | 385 |     |  |  |
| gtt gat ggt ttt cgt ttt gat ctt gca tcc ata atg acc aga ggt tcc     | 1308 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Met Thr Arg Gly Ser     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
|                                                                     | 390  |     |     |     |            |     | 395 |     |     |            |     | 400 |     |     |  |  |
| agt ctg tgg gat cca gtt aac gtg tat gga gct cca ata gaa ggt gac     | 1356 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Ser Leu Trp Asp Pro Val Asn Val Tyr Gly Ala Pro Ile Glu Gly Asp     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
|                                                                     | 405  |     |     |     |            | 410 |     |     |     |            | 415 |     |     |     |  |  |
| atg atc aca aca ggg aca cct ctt gtt act cca cca ctt att gac atg     | 1404 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Met Ile Thr Thr Gly Thr Pro Leu Val Thr Pro Pro Leu Ile Asp Met     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
|                                                                     | 420  |     |     |     |            | 425 |     |     |     | 430        |     |     |     |     |  |  |
| atc agc aat gac cca att ctt gga ggc gtc aag ctc att gct gaa gca     | 1452 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Ile Ser Asn Asp Pro Ile Leu Gly Gly Val Lys Leu Ile Ala Glu Ala     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| 435                                                                 |      |     |     |     | 440        |     |     |     | 445 |            |     |     |     | 450 |  |  |
| tgg gat gca gga ggc ctc tat caa gta ggt caa ttc cct cac tgg aat     | 1500 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Trp Asp Ala Gly Gly Leu Tyr Gln Val Gly Gln Phe Pro His Trp Asn     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
|                                                                     | 455  |     |     |     |            |     | 460 |     |     |            |     |     | 465 |     |  |  |
| gtt tgg tct gag tgg aat ggg aag tac cgg gac att gtg cgt caa ttc     | 1548 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Val Trp Ser Glu Trp Asn Gly Lys Tyr Arg Asp Ile Val Arg Gln Phe     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
|                                                                     | 470  |     |     |     |            |     | 475 |     |     |            |     | 480 |     |     |  |  |
| att aaa ggc act gat gga ttt gct ggt ggt ttt gcc gaa tgt ctt tgt     | 1596 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Ile Lys Gly Thr Asp Gly Phe Ala Gly Gly Phe Ala Glu Cys Leu Cys     |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
|                                                                     | 485  |     |     |     |            |     | 490 |     |     |            |     | 495 |     |     |  |  |
| gga agt cca cac cta tac cag gtaagttgtg gcaataacttg taaatgagtt       | 1647 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| Gly Ser Pro His Leu Tyr Gln                                         |      |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| 500                                                                 | 505  |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| gagtgaaatgt cacctggatt ttttatatat accacatgat gatacacatc taaatatata  | 1707 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| acaatcatag tgtatgcata tgcatttggc taagaagtat tagtgtatac actagtgccta  | 1767 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| tatatagggtt ttaacaccca acttgccaat gaaggaacat agggctttct agttatctta  | 1827 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| tttattttgtc cggtgaataa tccactgaaa aattccagcc atgtcatttt ttagggggggg | 1887 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| agaagaaaact atattgattt gccccctaa aagaagccat ctcagaattc ataggtaaagt  | 1947 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| tgctttttctg taaagaaagg aaaacgactt catactttct atcggtgcta acttagctcg  | 2007 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| atgtatatatt gtaagatgaa tgccaaattt aatttgctcg ataattlgat ctgttattca  | 2067 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |
| caaattttcta tttggtttct ctagaaatca aaccagtaac ttgttattgg cactgcaact  | 2127 |     |     |     |            |     |     |     |     |            |     |     |     |     |  |  |



|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| tcttattgat taatcag gca gga gga agg aaa cct tgg cac agt atc aac<br>Ala Gly Gly Arg Lys Pro Trp His Ser Ile Asn<br>510 515                              | 2177 |
| ttt gta tgt gca cat gat gga ttt acc ctg gct gat ttg gta aca tat<br>Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu Ala Asp Leu Val Thr Tyr<br>520 525 530     | 2225 |
| aat aag aag tac aat tta cca aat ggg gag aac aac aga gat gga gaa<br>Asn Lys Lys Tyr Asn Leu Pro Asn Gly Glu Asn Asn Arg Asp Gly Glu<br>535 540 545     | 2273 |
| aat cac aat ctt agc tgg aat tgt ggg gag gaa gga gaa ttc gca aga<br>Asn His Asn Leu Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Glu Phe Ala Arg<br>550 555 560         | 2321 |
| ttg tct gtc aaa aga ttg agg aag agg cag atg cgc aat ttc ttt gtt<br>Leu Ser Val Lys Arg Leu Arg Lys Arg Gln Met Arg Asn Phe Phe Val<br>565 570 575 580 | 2369 |
| tgt ctc atg gtt tct caa gga gtt cca atg ttc tac atg ggt gat gaa<br>Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met Phe Tyr Met Gly Asp Glu<br>585 590 595     | 2417 |
| tat ggc cac aca aaa ggg ggc aac aac aat aca tac tgc cat gat tct<br>Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn Thr Tyr Cys His Asp Ser<br>600 605 610     | 2465 |
| tat gtc aat tat ttt cgc tgg gat aaa aaa gaa caa tac tct gag ttg<br>Tyr Val Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys Glu Gln Tyr Ser Glu Leu<br>615 620 625     | 2513 |
| cac cga ttc tgc tgc ctc atg acc aaa ttc cgc aag gag tgc gag ggt<br>His Arg Phe Cys Cys Leu Met Thr Lys Phe Arg Lys Glu Cys Glu Gly<br>630 635 640     | 2561 |
| ctt ggc ctt gag gac ttt cca acg gcc aaa cgg ctg cag tgg cat ggt<br>Leu Gly Leu Glu Asp Phe Pro Thr Ala Lys Arg Leu Gln Trp His Gly<br>645 650 655 660 | 2609 |
| cat cag cct ggg aag cct gat tgg tct gag aat agc cga ttc gtt gcc<br>His Gln Pro Gly Lys Pro Asp Trp Ser Glu Asn Ser Arg Phe Val Ala<br>665 670 675     | 2657 |
| ttt tcc atg aaa gat gaa aga cag ggc gag atc tat gtg gcc ttc aac<br>Phe Ser Met Lys Asp Glu Arg Gln Gly Glu Ile Tyr Val Ala Phe Asn<br>680 685 690     | 2705 |
| acc agc cac tta ccg gcc gtt gtt gag ctc cca gag cgc gca ggg cgc<br>Thr Ser His Leu Pro Ala Val Val Glu Leu Pro Glu Arg Ala Gly Arg<br>695 700 705     | 2753 |
| cgg tgg gaa ccg gtg gtg gac aca ggc aag cca gca cca tac gac ttc<br>Arg Trp Glu Pro Val Val Asp Thr Gly Lys Pro Ala Pro Tyr Asp Phe<br>710 715 720     | 2801 |
| ctc acc gac gac tta cct gat cgc gct ctc acc ata cac cag ttc tcg<br>Leu Thr Asp Asp Leu Pro Asp Arg Ala Leu Thr Ile His Gln Phe Ser<br>725 730 735 740 | 2849 |



|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| cat ttc ctc tac tcc aac ctc tac ccc atg ctc agc tac tca tcc gtc | 2897 |
| His Phe Leu Tyr Ser Asn Leu Tyr Pro Met Leu Ser Tyr Ser Ser Val |      |
| 745 750 755                                                     |      |
| atc cta gta ttg cgc cct gat gtt tga gag acc aat ata tac agt aaa | 2945 |
| Ile Leu Val Leu Arg Pro Asp Val * Glu Thr Asn Ile Tyr Ser Lys   |      |
| 760 765 770                                                     |      |
| taa tat gtc tat atg taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa    | 2997 |
| * Tyr Val Tyr Met                                               |      |
| 775                                                             |      |

- (210) 2
- (211) 2997
- (212) DNS
- (213) *Triticum aestivum L. dv. Florida*
- (222) 2

ggtcggggcc ggccgcgcgc ctgcgacggt ggccgacccaa tgcgacggcg ggggaaggggg 60

tccggcgaggt gtgcgcgcgc gttgtcgagg cggcgacgaa ggtagaggac gaggggggagg 120

aggacgagcc ggtggcgagg gacaggtacg cgctcggcg cgcggtgcagg gtgctcgccg 180

gaatgccgc gccgctgggc gccaccgcgc tcgcgcggcg ggtcaatttc gccgtctatt 240

ccggcgaggc caccgcgcgc gcgctctgcc tcttcacgcc agaagatctc aaggcggtgg 300

ggttgccctc cgagtagagt tcatcagctt tgcgtgcgcc gcgcgcgcct tttttgggcc 360

tgcaatttaa gttttgtact ggggcaaatg ctgcaggata gggtgaccga ggaggttccc 420

cttgaccccc tgatgaatcg gaccgggaac gtgtggcatg tcttcacga aggcgagctg 480

cacaacatgc tttacgggta caggttcgac ggcaccttg ctctcactg cgggcactac 540

cttgatgttt ccaatgtcgt ggtggatcct tatgctaagg cagtataag ccgaggggag 600

tatggtgttc cagcgcgagg taacaattgc tggcctcaga tggctggcat gatccctctt 660

ccatatagca cgtttgattg ggaaggcgac ctacctctaa gatctctca aaaggacctg 720

gtaatatatg agatgcactt gcgtggatc acgaagcatg attcaagcaa tgtagaacat 780

ccgggtactt tcattggagc tgtgtcgaag cttgactatt tgaaggagct tggagttaat 840

tgtattgaat taatgccctg ccatgagttc aacgagctgg agtactcaac ctcttcttcc 900

aagatgaact tttggggata ttctaccata aacttctttt caccaatgac aagatacaca 960

tcaggcgagg taaaaaactg tgggcgtgat gccataaatg agttcaaac ttttgaaga 1020

gaggctcaca aacgggggaat tgaggtgatc ctggatgttg tcttcaacca tacagctgag 1080

ggtaatgaga atggtccaat attatcattt aagggggtcg ataatactac atactatatg 1140

cttgcaacca agggagagtt ttataactat tctggctgtg ggaatacctt caactgtaat 1200

cactctgtgg ttgcgtcaatt cattgtagat tgtttaagat actgggtgac ggaaatgcat 1260

ggtgatggtt ttcgttttga tcttgcaccc ataatgacca gaggttccag tctgtgggat 1320



ccagttaacg tgtatggagc tocaatagaa ggtgacatga tcacaacagg gacacctctt 1380  
gttactccac cacttattga catgatcagc aatgacccaa ttcttggagg cgtcaagctc 1440  
attgctgaag catgggatgc aggaggcctc tatcaagtag gtcattccc tcaactggaat 1500  
gtttggtctg agtggaatgg gaagtaccgg gacattgtgc gtcaattcat taaaggcact 1560  
gatggatttg ctggtggttt tgcogaatgt ctttgtggaa gtccacacct ataccaggta 1620  
agttgtggca atacttgtaa atgagttgag tgaatgtcac ctggattttt tatatatacc 1680  
acatgatgat acacatctaa atatataaca atcatagtgt atgcatatgc atttggctaa 1740  
gaagtattag tgtatacact agtgctatat ataggtttta acaccaact tgccaatgaa 1800  
ggaacatagg gctttctagt tatcttattt atttgtccgg tgaataatcc actgaaaaat 1860  
tccagccatg tcatttttta gggggggaga agaaactata ttgatttgcc cccctaaaag 1920  
aagccatctc agaattcata ggtaagttgc tttctgttaa agaaaggaaa acgacttcat 1980  
actttctatc ggtgctaact tagctcgatg tatatttgta agatgaatgc caattttaat 2040  
ttgtcggata atttgatctg ttattcacia atttctattt ggtttctcta gaaatcaaac 2100  
cagtaacttg ttattggcac tgcaacttct tattgattaa tcaggcagga ggaaggaaac 2160  
cttggcacag tatcaacttt gtatgtgcac atgatggatt tacactggct gatttggtaa 2220  
catataataa gaagtacat ttaccaaatg gggagaacaa cagagatgga gaaaatcaca 2280  
atcttagctg gaattgtggg gaggaaggag aattcgcaag attgtctgtc aaaagattga 2340  
ggaagaggca gatgcgcaat ttctttgttt gtctcatggt ttotcaagga gttccaatgt 2400  
tctacatggg tgatgaatat ggccacacaa aagggggcaa caacaatata tactgccatg 2460  
attcttatgt caattatttt cgctgggata aaaaagaaca atactctgag ttgcaccgat 2520  
totgtgcct catgaccaa ttccgcaagg agtgcgaggg tcttggcctt gaggacttct 2580  
caacggccaa acggctgcag tggcatggtc atcagcctgg gaagcctgat tgggtctgaga 2640  
atagccgatt cgttgccttt tccatgaaag atgaaagaca gggcgagatc tatgtggcct 2700  
tcaacaccag ccacttaccg gccgtgttg agtcccaga gcgcgcaggg cgccggtggg 2760  
aaccggtggt ggacacaggc aagccagcac catacgactt cctcaccgac gacttacctg 2820  
atcgcgctct caccatacac cagtctcgc atttctcta ctccaacctc taccctatgc 2880  
tcagctactc atcggtcac ctagtattgc gccctgatgt ttgagagacc aatatataca 2940  
gtaaataata tgtctatatg taaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 2997



- (210) 3  
 (211) 764  
 (212) PRT  
 (213) *Triticum aestivum* L. dv. Florida  
 (400) 3

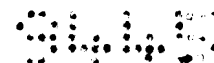
Ser Gly Pro Ala Pro Arg Leu Arg Arg Trp Arg Pro Asn Ala Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Gly Val Gly Glu Val Cys Ala Ala Val Val Glu Ala Ala Thr  
 20 25 30  
 Lys Val Glu Asp Glu Gly Glu Glu Asp Glu Pro Val Ala Glu Asp Arg  
 35 40 45  
 Tyr Ala Leu Gly Gly Ala Cys Arg Val Leu Ala Gly Met Pro Ala Pro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



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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Phe | Ala | Arg | Leu | Ser | Val | Lys | Arg | Leu | Arg | Lys | Arg | Gln | Met | Arg | 565 | 570 | 575 |     |
| Asn | Phe | Phe | Val | Cys | Leu | Met | Val | Ser | Gln | Gly | Val | Pro | Met | Phe | Tyr | 580 | 585 | 590 |     |
| Met | Gly | Asp | Glu | Tyr | Gly | His | Thr | Lys | Gly | Gly | Asn | Asn | Asn | Thr | Tyr | 595 | 600 | 605 |     |
| Cys | His | Asp | Ser | Tyr | Val | Asn | Tyr | Phe | Arg | Trp | Asp | Lys | Lys | Glu | Gln | 610 | 615 | 620 |     |
| Tyr | Ser | Glu | Leu | His | Arg | Phe | Cys | Cys | Leu | Met | Thr | Lys | Phe | Arg | Lys | 625 | 630 | 635 | 640 |
| Glu | Cys | Glu | Gly | Leu | Gly | Leu | Glu | Asp | Phe | Pro | Thr | Ala | Lys | Arg | Leu | 645 | 650 | 655 |     |
| Gln | Trp | His | Gly | His | Gln | Pro | Gly | Lys | Pro | Asp | Trp | Ser | Glu | Asn | Ser | 660 | 665 | 670 |     |
| Arg | Phe | Val | Ala | Phe | Ser | Met | Lys | Asp | Glu | Arg | Gln | Gly | Glu | Ile | Tyr | 675 | 680 | 685 |     |
| Val | Ala | Phe | Asn | Thr | Ser | His | Leu | Pro | Ala | Val | Val | Glu | Leu | Pro | Glu | 690 | 695 | 700 |     |
| Arg | Ala | Gly | Arg | Arg | Trp | Glu | Pro | Val | Val | Asp | Thr | Gly | Lys | Pro | Ala | 705 | 710 | 715 | 720 |
| Pro | Tyr | Asp | Phe | Leu | Thr | Asp | Asp | Leu | Pro | Asp | Arg | Ala | Leu | Thr | Ile | 725 | 730 | 735 |     |
| His | Gln | Phe | Ser | His | Phe | Leu | Tyr | Ser | Asn | Leu | Tyr | Pro | Met | Leu | Ser | 740 | 745 | 750 |     |
| Tyr | Ser | Ser | Val | Ile | Leu | Val | Leu | Arg | Pro | Asp | Val |     |     |     |     | 755 | 760 |     |     |

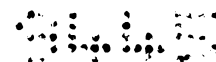




(210) 4  
(211) 24  
(212) DNS  
(213) mesterséges szekvencia  
(220)  
(223) A mesterséges szekvencia leírása: láncindító  
(400) 4  
aaaggcccaa tattatcctt tagg 24

(210) 5  
(211) 31  
(212) DNS  
(213) mesterséges szekvencia  
(220)  
(223) A mesterséges szekvencia leírása: láncindító  
(400) 5  
gccatttcaa ccgttctgaa gtcgggaagt c 31

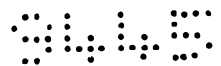
(210) 6  
(211) 2437  
(212) DNS  
(213) *Triticum aestivum L. cv. Florida*  
(220)  
(222) cds  
(223) (16) ... (2304)



(400)

6

|            |       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gaattcggca | cgagg | ccg | gcg | ccg | cgc | ctg | cga | cgg | tgg | cgg | ccc | aat | gcg | 51  |     |     |
|            |       | Pro | Ala | Pro | Arg | Leu | Arg | Arg | Trp | Arg | Pro | Asn | Ala |     |     |     |
|            |       | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |
| acg        | gcg   | ggg | aag | ggg | gtc | ggc | gag | gtc | tgc | goc | gcg | gtt | gtc | gag | gtg | 99  |
| Thr        | Ala   | Gly | Lys | Gly | Val | Gly | Glu | Val | Cys | Ala | Ala | Val | Val | Glu | Val |     |
|            |       | 15  |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |
| gcg        | acg   | aag | gcc | gag | gat | gag | ggg | gag | gag | gac | gag | ccg | gtg | gcg | gag | 147 |
| Ala        | Thr   | Lys | Ala | Glu | Asp | Glu | Gly | Glu | Glu | Asp | Glu | Pro | Val | Ala | Glu |     |
|            |       | 30  |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |
| gac        | agg   | tac | gcg | ctc | ggc | ggc | gcg | tgc | agg | gtg | ctc | gcc | gga | atg | ccc | 195 |
| Asp        | Arg   | Tyr | Ala | Leu | Gly | Gly | Ala | Cys | Arg | Val | Leu | Ala | Gly | Met | Pro |     |
|            |       |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |
| acg        | ccg   | ctg | ggc | gcc | acc | gcg | ctc | gcc | ggc | ggg | gtc | aat | ttc | gcc | gtc | 243 |
| Thr        | Pro   | Leu | Gly | Ala | Thr | Ala | Leu | Ala | Gly | Gly | Val | Asn | Phe | Ala | Val |     |
|            |       |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |
| tac        | tcc   | ggc | gga | gcc | aca | gcc | gcg | gcg | ctc | tgc | ctc | ttc | acg | cca | gaa | 291 |
| Tyr        | Ser   | Gly | Gly | Ala | Thr | Ala | Ala | Ala | Leu | Cys | Leu | Phe | Thr | Pro | Glu |     |
|            |       |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |
| gat        | ctc   | aag | gcg | gat | agg | gtg | acg | gag | gag | gtt | ccc | ctt | gac | ccc | ctg | 339 |
| Asp        | Leu   | Lys | Ala | Asp | Arg | Val | Thr | Glu | Glu | Val | Pro | Leu | Asp | Pro | Leu |     |
|            |       | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |
| atg        | aat   | cgg | act | ggg | aac | gta | tgg | cat | gtc | ttc | atc | gaa | ggc | gag | ctg | 387 |
| Met        | Asn   | Arg | Thr | Gly | Asn | Val | Trp | His | Val | Phe | Ile | Glu | Gly | Glu | Leu |     |
|            | 110   |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |
| cag        | gac   | atg | ctt | tac | ggg | tac | agg | ttc | gac | ggc | acc | ttt | gct | cct | cac | 435 |
| Gln        | Asp   | Met | Leu | Tyr | Gly | Tyr | Arg | Phe | Asp | Gly | Thr | Phe | Ala | Pro | His |     |
|            | 125   |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |
| tgc        | ggg   | cac | tac | ctt | gat | gtt | tcc | aat | gtc | gtg | gtg | gat | cct | tat | gct | 483 |
| Cys        | Gly   | His | Tyr | Leu | Asp | Val | Ser | Asn | Val | Val | Val | Asp | Pro | Tyr | Ala |     |
|            |       |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |



|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| aag gca gtg ata agc cga ggg gag tat ggt gtt ccg gcg cgt ggt aac | 531  |
| Lys Ala Val Ile Ser Arg Gly Glu Tyr Gly Val Pro Ala Arg Gly Asn |      |
| 160 165 170                                                     |      |
| aat tgc tgg cct cag atg gct ggc atg atc cct ctt cca tat agc acg | 579  |
| Asn Cys Trp Pro Gln Met Ala Gly Met Ile Pro Leu Pro Tyr Ser Thr |      |
| 175 180 185                                                     |      |
| ttt gat tgg gaa ggc gac cta cct cta aga tat cct caa aag gac ctg | 627  |
| Phe Asp Trp Glu Gly Asp Leu Pro Leu Arg Tyr Pro Gln Lys Asp Leu |      |
| 190 195 200                                                     |      |
| gta ata tat gag atg cac ttg cgt gga ttc acg aag cat gat tca agc | 675  |
| Val Ile Tyr Glu Met His Leu Arg Gly Phe Thr Lys His Asp Ser Ser |      |
| 205 210 215 220                                                 |      |
| aat gta gaa cat ccc ggt act ttc att ggg gct gtg tcg aag ctt gac | 723  |
| Asn Val Glu His Pro Gly Thr Phe Ile Gly Ala Val Ser Lys Leu Asp |      |
| 225 230 235                                                     |      |
| tat ttg aag gag ctt gga gtt aat tgt att gag tta atg ccc tgc cat | 771  |
| Tyr Leu Lys Glu Leu Gly Val Asn Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His |      |
| 240 245 250                                                     |      |
| gag ttc aac gag ctg gag tac tca acc tct tct tcc aag atg aac ttt | 819  |
| Glu Phe Asn Glu Leu Glu Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Lys Met Asn Phe |      |
| 255 260 265                                                     |      |
| tgg gga tat tct acc ata aac ttc ttt tca cca atg acg aga tac aca | 867  |
| Trp Gly Tyr Ser Thr Ile Asn Phe Phe Ser Pro Met Thr Arg Tyr Thr |      |
| 270 275 280                                                     |      |
| tca ggc ggg ata aaa aac tgt ggg cgt gat gcc ata aat gag ttc aaa | 915  |
| Ser Gly Gly Ile Lys Asn Cys Gly Arg Asp Ala Ile Asn Glu Phe Lys |      |
| 285 290 295 300                                                 |      |
| act ttt gta aga gag gct cac aaa cgg gga att gag gtg atc ctg gat | 963  |
| Thr Phe Val Arg Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Leu Asp |      |
| 305 310 315                                                     |      |
| gtt gtc ttc aac cat aca gct gag ggt aat gag aat ggt cca ata tta | 1011 |
| Val Val Phe Asn His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu |      |
| 320 325 330                                                     |      |
| tca ttt agg ggg gtc gat aat act aca tac tat atg ctt gca ccc aag | 1059 |
| Ser Phe Arg Gly Val Asp Asn Thr Thr Tyr Tyr Met Leu Ala Pro Lys |      |
| 335 340 345                                                     |      |
| gga gag ttt tat aac tat tct ggc tgt ggg aat acc ttc aac tgt aat | 1107 |
| Gly Glu Phe Tyr Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn |      |
| 350 355 360                                                     |      |
| cat cct gtg gtt cgt caa ttc att gta gat tgt tta aga tac tgg gtg | 1155 |
| His Pro Val Val Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val |      |
| 365 370 375 380                                                 |      |
| acg gaa atg cat gtt gat ggt ttt cgt ttt gat ctt gca tcc ata atg | 1203 |
| Thr Glu Met His Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Met |      |
| 385 390 395                                                     |      |
| acc aga ggt tcc agt ctg tgg gat cca gtt aac gtg tat gga gct cca | 1251 |
| Thr Arg Gly Ser Ser Leu Trp Asp Pro Val Asn Val Tyr Gly Ala Pro |      |
| 400 405 410                                                     |      |



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| ata | gaa | ggt | gac | atg | atc | aca | aca | ggg | aca | cct | ctt | ggt | act | cca | cca | 1299 |
| Ile | Glu | Gly | Asp | Met | Ile | Thr | Thr | Gly | Thr | Pro | Leu | Val | Thr | Pro | Pro |      |
|     |     | 415 |     |     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |      |
| ctt | att | gac | atg | atc | agc | aat | gac | cca | att | ctt | gga | ggc | gtc | aag | ctc | 1347 |
| Leu | Ile | Asp | Met | Ile | Ser | Asn | Asp | Pro | Ile | Leu | Gly | Gly | Val | Lys | Leu |      |
|     |     | 430 |     |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |      |
| ggt | gct | gaa | gca | tgg | gat | gca | gga | ggc | ctc | tat | caa | gta | ggt | caa | ttc | 1395 |
| Val | Ala | Glu | Ala | Trp | Asp | Ala | Gly | Gly | Leu | Tyr | Gln | Val | Gly | Gln | Phe |      |
|     |     | 445 |     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |      |
| cct | cac | tgg | aat | gtt | tgg | tct | gag | tgg | aat | ggg | aag | tac | cgg | gac | att | 1443 |
| Pro | His | Trp | Asn | Val | Trp | Ser | Glu | Trp | Asn | Gly | Lys | Tyr | Arg | Asp | Ile |      |
|     |     |     |     | 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |      |
| gtg | cgt | caa | ttc | att | aaa | ggc | act | gat | gga | ttt | gct | ggt | ggt | ttt | gcc | 1491 |
| Val | Arg | Gln | Phe | Ile | Lys | Gly | Thr | Asp | Gly | Phe | Ala | Gly | Gly | Phe | Ala |      |
|     |     |     | 480 |     |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     | 490 |     |      |
| gaa | tgt | ctt | tgt | gga | agt | cca | cac | cta | tac | cag | gca | gga | gga | agg | aaa | 1539 |
| Glu | Cys | Leu | Cys | Gly | Ser | Pro | His | Leu | Tyr | Gln | Ala | Gly | Gly | Arg | Lys |      |
|     |     | 495 |     |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |      |
| cct | tgg | cac | agt | atc | aac | ttt | gta | tgt | gca | cac | gat | gga | ttt | aca | ctg | 1587 |
| Pro | Trp | His | Ser | Ile | Asn | Phe | Val | Cys | Ala | His | Asp | Gly | Phe | Thr | Leu |      |
|     |     | 510 |     |     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     |      |
| gct | gat | ttg | gta | aca | tat | aat | aac | aag | tac | aat | tta | cca | aat | ggg | gag | 1635 |
| Ala | Asp | Leu | Val | Thr | Tyr | Asn | Asn | Lys | Tyr | Asn | Leu | Pro | Asn | Gly | Glu |      |
|     |     | 525 |     |     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |      |
| aac | aac | aga | gat | gga | gaa | aat | cac | aat | ctt | agc | tgg | aat | tgt | ggg | gag | 1683 |
| Asn | Asn | Arg | Asp | Gly | Glu | Asn | His | Asn | Leu | Ser | Trp | Asn | Cys | Gly | Glu |      |
|     |     |     |     | 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |      |
| gaa | gga | gaa | ttc | gca | aga | ttg | tct | gtc | aaa | aga | ttg | agg | aag | agg | cag | 1731 |
| Glu | Gly | Glu | Phe | Ala | Arg | Leu | Ser | Val | Lys | Arg | Leu | Arg | Lys | Arg | Gln |      |
|     |     |     | 560 |     |     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |      |
| atg | cgc | aat | ttc | ttt | gtt | tgt | ctc | atg | gtt | tct | caa | gga | gtt | cca | atg | 1779 |
| Met | Arg | Asn | Phe | Phe | Val | Cys | Leu | Met | Val | Ser | Gln | Gly | Val | Pro | Met |      |
|     |     | 575 |     |     |     |     | 580 |     |     |     |     |     | 585 |     |     |      |
| ttc | tac | atg | ggt | gat | gaa | tat | ggc | cac | aca | aaa | ggg | ggc | aac | aac | aat | 1827 |
| Phe | Tyr | Met | Gly | Asp | Glu | Tyr | Gly | His | Thr | Lys | Gly | Gly | Asn | Asn | Asn |      |
|     |     | 590 |     |     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     |      |
| aca | tac | tgc | cat | gat | tct | tat | gtc | aat | tat | ttt | cgc | tgg | gat | aaa | aaa | 1875 |
| Thr | Tyr | Cys | His | Asp | Ser | Tyr | Val | Asn | Tyr | Phe | Arg | Trp | Asp | Lys | Lys |      |
|     |     | 605 |     |     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |      |
| gaa | caa | tac | tct | gac | ttg | cac | cga | ttc | tgt | tgc | ctc | atg | acc | aaa | ttc | 1923 |
| Glu | Gln | Tyr | Ser | Asp | Leu | His | Arg | Phe | Cys | Cys | Leu | Met | Thr | Lys | Phe |      |
|     |     |     |     | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |      |
| cgc | aag | gag | tgc | gag | ggt | ctt | ggc | ctt | gag | gat | ttt | cca | acg | gcc | gaa | 1971 |
| Arg | Lys | Glu | Cys | Glu | Gly | Leu | Gly | Leu | Glu | Asp | Phe | Pro | Thr | Ala | Glu |      |
|     |     |     | 640 |     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |      |



cgg ctg cag tgg cat ggt cat cag cct ggg aag cct gat tgg tct gag 2019  
 Arg Leu Gln Trp His Gly His Gln Pro Gly Lys Pro Asp Trp Ser Glu  
 655 660 665  
 aat agc cga ttc gtt gcc ttt tcc atg aaa gat gaa aga cag ggc gag 2067  
 Asn Ser Arg Phe Val Ala Phe Ser Met Lys Asp Glu Arg Gln Gly Glu  
 670 675 680  
 atc tat gtg gcc ttc aac acc agc cac tta cgg gcc gtt gtt gag ctc 2115  
 Ile Tyr Val Ala Phe Asn Thr Ser His Leu Pro Ala Val Val Glu Leu  
 685 690 695 700  
 ccg gag cgc aca ggg cgc cgg tgg gaa ccg gtg gtg gac aca ggc aag 2163  
 Pro Glu Arg Thr Gly Arg Arg Trp Glu Pro Val Val Asp Thr Gly Lys  
 705 710 715  
 cca gca cca tac gac ttc ctc act gac gac tta cct gat cgc gct ctc 2211  
 Pro Ala Pro Tyr Asp Phe Leu Thr Asp Asp Leu Pro Asp Arg Ala Leu  
 720 725 730  
 acc ata cac cag ttc tct cat ttc ctc aac tcc aac ctc tac ccc atg 2259  
 Thr Ile His Gln Phe Ser His Phe Leu Asn Ser Asn Leu Tyr Pro Met  
 735 740 745  
 ctc agc tac tca tcg gtc atc cta gta ttg cgc cct gat gtt tga 2304  
 Leu Ser Tyr Ser Ser Val Ile Leu Val Leu Arg Pro Asp Val  
 750 755 760  
 gaggcggata tacagtaaat aatatgtata tatgtagtcc ttggcgtat tatcagtgtg 2364  
 cacaattgct ctattgccaa tgatctatcc gatccacaga tacatgtgca aaaaaaaaaa 2424  
 aaaaaaactc gag 2437

(210) 7

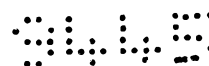
(211) 762

(212) PRT

(213) *Triticum aestivum* L. cv. Florida

(400) 7

Pro Ala Pro Arg Leu Arg Arg Trp Arg Pro Asn Ala Thr Ala Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Gly Val Gly Glu Val Cys Ala Ala Val Val Glu Val Ala Thr Lys Ala  
 20 25 30  
 Glu Asp Glu Gly Glu Glu Asp Glu Pro Val Ala Glu Asp Arg Tyr Ala  
 35 40 45  
 Leu Gly Gly Ala Cys Arg Val Leu Ala Gly Met Pro Thr Pro Leu Gly  
 50 55 60  
 Ala Thr Ala Leu Ala Gly Gly Val Asn Phe Ala Val Tyr Ser Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Ala Thr Ala Ala Ala Leu Cys Leu Phe Thr Pro Glu Asp Leu Lys Ala  
 85 90 95  
 Asp Arg Val Thr Glu Glu Val Pro Leu Asp Pro Leu Met Asn Arg Thr  
 100 105 110



Gly Asn Val Trp His Val Phe Ile Glu Gly Glu Leu Gln Asp Met Leu  
 115 120 125  
 Tyr Gly Tyr Arg Phe Asp Gly Thr Phe Ala Pro His Cys Gly His Tyr  
 130 135 140  
 Leu Asp Val Ser Asn Val Val Val Asp Pro Tyr Ala Lys Ala Val Ile  
 145 150 155 160  
 Ser Arg Gly Glu Tyr Gly Val Pro Ala Arg Gly Asn Asn Cys Trp Pro  
 165 170 175  
 Gln Met Ala Gly Met Ile Pro Leu Pro Tyr Ser Thr Phe Asp Trp Glu  
 180 185 190  
 Gly Asp Leu Pro Leu Arg Tyr Pro Gln Lys Asp Leu Val Ile Tyr Glu  
 195 200 205  
 Met His Leu Arg Gly Phe Thr Lys His Asp Ser Ser Asn Val Glu His  
 210 215 220  
 Pro Gly Thr Phe Ile Gly Ala Val Ser Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Val Asn Cys Ile Glu Leu Met Pro Cys His Glu Phe Asn Glu  
 245 250 255  
 Leu Glu Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Lys Met Asn Phe Trp Gly Tyr Ser  
 260 265 270  
 Thr Ile Asn Phe Phe Ser Pro Met Thr Arg Tyr Thr Ser Gly Gly Ile  
 275 280 285  
 Lys Asn Cys Gly Arg Asp Ala Ile Asn Glu Phe Lys Thr Phe Val Arg  
 290 295 300  
 Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Glu Val Ile Leu Asp Val Val Phe Asn  
 305 310 315 320  
 His Thr Ala Glu Gly Asn Glu Asn Gly Pro Ile Leu Ser Phe Arg Gly  
 325 330 335  
 Val Asp Asn Thr Thr Tyr Tyr Met Leu Ala Pro Lys Gly Glu Phe Tyr  
 340 345 350  
 Asn Tyr Ser Gly Cys Gly Asn Thr Phe Asn Cys Asn His Pro Val Val  
 355 360 365  
 Arg Gln Phe Ile Val Asp Cys Leu Arg Tyr Trp Val Thr Glu Met His  
 370 375 380  
 Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Ala Ser Ile Met Thr Arg Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Leu Trp Asp Pro Val Asn Val Tyr Gly Ala Pro Ile Glu Gly Asp  
 405 410 415  
 Met Ile Thr Thr Gly Thr Pro Leu Val Thr Pro Pro Leu Ile Asp Met  
 420 425 430  
 Ile Ser Asn Asp Pro Ile Leu Gly Gly Val Lys Leu Val Ala Glu Ala  
 435 440 445



Trp Asp Ala Gly Gly Leu Tyr Gln Val Gly Gln Phe Pro His Trp Asn  
 450 455 460  
 Val Trp Ser Glu Trp Asn Gly Lys Tyr Arg Asp Ile Val Arg Gln Phe  
 465 470 475 480  
 Ile Lys Gly Thr Asp Gly Phe Ala Gly Gly Phe Ala Glu Cys Leu Cys  
 485 490 495  
 Gly Ser Pro His Leu Tyr Gln Ala Gly Gly Arg Lys Pro Trp His Ser  
 500 505 510  
 Ile Asn Phe Val Cys Ala His Asp Gly Phe Thr Leu Ala Asp Leu Val  
 515 520 525  
 Thr Tyr Asn Asn Lys Tyr Asn Leu Pro Asn Gly Glu Asn Asn Arg Asp  
 530 535 540  
 Gly Glu Asn His Asn Leu Ser Trp Asn Cys Gly Glu Glu Gly Glu Phe  
 545 550 555 560  
 Ala Arg Leu Ser Val Lys Arg Leu Arg Lys Arg Gln Met Arg Asn Phe  
 565 570 575  
 Phe Val Cys Leu Met Val Ser Gln Gly Val Pro Met Phe Tyr Met Gly  
 580 585 590  
 Asp Glu Tyr Gly His Thr Lys Gly Gly Asn Asn Asn Thr Tyr Cys His  
 595 600 605  
 Asp Ser Tyr Val Asn Tyr Phe Arg Trp Asp Lys Lys Glu Gln Tyr Ser  
 610 615 620  
 Asp Leu His Arg Phe Cys Cys Leu Met Thr Lys Phe Arg Lys Glu Cys  
 625 630 635 640  
 Glu Gly Leu Gly Leu Glu Asp Phe Pro Thr Ala Glu Arg Leu Gln Trp  
 645 650 655  
 His Gly His Gln Pro Gly Lys Pro Asp Trp Ser Glu Asn Ser Arg Phe  
 660 665 670  
 Val Ala Phe Ser Met Lys Asp Glu Arg Gln Gly Glu Ile Tyr Val Ala  
 675 680 685  
 Phe Asn Thr Ser His Leu Pro Ala Val Val Glu Leu Pro Glu Arg Thr  
 690 695 700  
 Gly Arg Arg Trp Glu Pro Val Val Asp Thr Gly Lys Pro Ala Pro Tyr  
 705 710 715 720  
 Asp Phe Leu Thr Asp Asp Leu Pro Asp Arg Ala Leu Thr Ile His Gln  
 725 730 735  
 Phe Ser His Phe Leu Asn Ser Asn Leu Tyr Pro Met Leu Ser Tyr Ser  
 740 745 750  
 Ser Val Ile Leu Val Leu Arg Pro Asp Val  
 755 760

(210) 8  
 (211) 20  
 (212) DNS  
 (213) mesterséges szekvencia  
 (220)  
 (223) A mesterséges szekvencia leírása: láncindító  
 (400) 8

gctttacggg tacaggttcg 20

(210) 9  
 (211) 18  
 (212) DNS  
 (213) mesterséges szekvencia  
 (220)  
 (223) A mesterséges szekvencia leírása: láncindító  
 (400) 9

aattccccgt ttgtgagc 18

(210) 10  
 (211) 51  
 (212) DNS  
 (213) Mesterséges szekvencia  
 (220)  
 (223) A mesterséges szekvencia leírása: láncindító  
 (400) 10

gcggtacctc tagaaggaga tatacatatg gcggaggaca ggtacgcgct c 51



|                                       |                                              |    |
|---------------------------------------|----------------------------------------------|----|
| (210)                                 | 11                                           |    |
| (211)                                 | 33                                           |    |
| (212)                                 | DNS                                          |    |
| (213)                                 | Mesterséges szekvencia                       |    |
| (220)                                 |                                              |    |
| (223)                                 | A mesterséges szekvencia leírása: láncindító |    |
| (400)                                 | 11                                           |    |
| gctcgagtcg actcaaacaat cagggcgcaa tac |                                              | 33 |



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Búzaeredetű izoamiláz funkciójú fehérjét kódoló nukleinsavmolekula, amely az alábbiak bármelyike:

a) a 3. szekvencia szerinti aminosavszekvenciát tartalmazó fehérjét kódoló nukleinsavmolekula,

b) a 2. azonosítószámú szekvencia szerinti nukleotid-szekvenciát, vagy ennek egy részét, vagy az ennek megfelelő ribonukleotid-szekvenciát tartalmazó nukleinsavmolekula,

c) az (a) vagy a (b) pontok szerinti nukleinsavmolekulákkal hibridizáló vagy ezekkel komplementer nukleinsavmolekula, és

d) az (a), a (b) vagy a (c) pontok szerinti nukleinsavmolekulák szekvenciájából a genetikai kód degeneráltsága miatt származó nukleinsavmolekula.

és az (a), (c) vagy (d) pont szerinti nukleinsavmolekula 90%-nál nagyobb mértékben homológ a 2. azonosítószám szerinti szekvenciával.

2. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, amely DNS-molekula.

3. A 2. igénypont szerinti DNS-molekula, amely cDNS-molekula.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekula, amely szabályozó elemeket tartalmaz.

5. Az 1. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, amely RNS-molekula.



6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulával specifikusan hibridizáló nukleinsavmolekula, amely 90%-nál nagyobb mértékben homológ a 2. azonosítószám szerinti szekvenciával.

7. A 6. igénypont szerinti nukleinsavmolekula, amely legalább 15 nukleotid hosszúságú oligonukleotid.

8. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti DNS-molekulát tartalmazó vektor.

9. A 8. igénypont szerinti vektor, amelyben a nukleinsavmolekula szensz orientációban olyan szabályozó elemekhez van kapcsolva, amelyek pro- vagy eukarióta sejtekben transzlatálható RNS transzkripcióját és szintézisét biztosítják.

10. A 8. igénypont szerinti vektor, amelyben a nukleinsavmolekula szensz orientációban olyan szabályozó elemekhez van kapcsolva, amelyek pro- vagy eukarióta sejtekben transzlációra alkalmatlan RNS transzkripcióját és szintézisét biztosítják.

11. A 8. igénypont szerinti vektor, amelyben a nukleinsavmolekula antiszensz orientációban olyan szabályozó elemekhez van kapcsolva, amelyek pro- vagy eukarióta sejtekben transzlációra alkalmatlan RNS transzkripcióját és szintézisét biztosítják.

12. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulával vagy a 8-11. igénypontok bármelyike szerinti vektorral transzformált gazdasejt, vagy az ilyen sejtből származó gazdasejt.



14. Eljárás a 13. igénypont szerinti fehérje előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 12. igénypont szerinti gazdasejtet a fehérje szintézisére alkalmas körülmények között tenyésztjük és a fehérjét izoláljuk a tenyésztett sejtekből és/vagy a tenyésztő tápközegből.

15. Eljárás transzgénikus növényi sejt előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

a) az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulát, vagy

b) a 8-11. igénypontok bármelyike szerinti vektort egy növényi sejt genomjába integráljuk.

16. Transzgénikus növényi sejt, amely az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulával vagy a 8-11. igénypontok szerinti vektorral van transzformálva, vagy egy ilyen sejtől származó transzgénikus növényi sejt.

17. Eljárás transzgénikus növényi sejt előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

a1) az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti nukleinsavmolekulát, vagy

a2) a 8-11. igénypontok bármelyike szerinti vektort egy növényi sejt genomjába integráljuk, és

b) a növényi sejtől teljes növényt regenerálunk.

18. A 16. igénypont szerinti növényi sejtet tartalmazó növény.

19. A 18. igénypont szerinti növény, amely terménynövény.

20. A 19. igénypont szerinti növény, amely keményítőt raktározó növény.

21. A 20. igénypont szerinti növény, amely egyszikű növény vagy kukorica.

22. A 21. igénypont szerinti növény, amely árpa-, rozs- vagy búzanövény

23. A 18-22. igénypontok bármelyike szerinti növény szaporító anyaga.

24. A 16. igénypont szerinti növény, a 18-22. igénypontok bármelyike szerinti növény vagy a 23. igénypont szerinti szaporító anyag alkalmazása keményítő előállítására.

46 oldal



A meghatalmazott:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Svingor Ádám