

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.09.2000**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **01.10.1999**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/9912305**
(33) Země priority: **FR**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.06.2002**
(Věstník č. 6/2002)
(86) PCT číslo: **PCT/FR00/02596**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/25439**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1139

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. C1. ⁷:

C 12 N 15/29

C 12 N 15/82

A 01 H 5/00

(71) Přihlašovatel:

BIOGEMMA, Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C. N. R. S.), Paris Cedex, FR;

(72) Původce:

Bonello Jean-Francois, Bussy St Georges, FR;
Rogowsky Peter, Lyon, FR;
Perez Pascual, Chanonat, FR;

(74) Zástupce:

Kalenský Petr JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Specifické promotory albumenu rostlinných zrn

(57) Anotace:

Nukleotidová promotorová izolovaná sekvence umožňující expresi kódujících sekvencí, na kterých je vázána, přičemž exprese je i) specifická pro oblast albumenu obklopující klíček v zrnech krytosemenných rostlin a ii) působí obzvláště v časných stádiích albumenu. Expresní kazeta ji obsahující, expresní vektor obsahující expresní kazetu. Použití expresní kazety k získání transgenní krytosemenné rostliny se zlepšenými zemědělskými nebo nutričními vlastnostmi.

20.03.00

PV 202-1139

14649

Specifické promotory albumenu rostlinných zrn

Oblast techniky

Vynález se týká řízení exprese genů v průběhu vývoje albumenu. Obzvláště se týká nukleotidových promotorových sekvencí umožňujících specifickou expresi na rozhraní mezi klíčkem a albumenem a časnou během vývoje albumenu.

Dosavadní stav techniky

Albumen, charakteristický útvar zrna krytosemenných rostlin, je živnou tkání pro klíček. Je to komplexní tkáň svou strukturou a svým vývojem zejména u obilovin. Středová zóna albumenu sestává z velkých buněk s vakuolami, ve kterých jsou uloženy zásoby škrobu a proteinů, zatímco oblast, obklopující klíček, se vyznačuje buňkami spíše menšími obsazenými do velké míry cytoplasmou. Dosud není známa funkce těchto buněk nazývaných "husté cytoplasmové buňky" (Schel J.H.N. a kol., Can. J. Biol. 62, str. 2842 až 2856, 1984). V roce 1997 identifikovali Opsahl a kol. (Opsahl-Ferstad H.D. a kol., The Plant J. 12, str. 235 až 246, 1997) gen vyskytující se specificky v této oblasti kolem klíčku kukuřice, gen, který nazvali ESR ("Embryo Surrounding Region").

Autoři vynálezu nyní izolovali promotorové nukleotidové sekvence umožňující expresi kódujících sekvencí, na které by mohly být vázány, což je specifické pro oblast albumenu obklopující klíček v zrnech krytosemenných rostlin a které zasahují zejména v raných stádiích vývoje albumenu. Tyto promotorové sekvence jsou obzvláště užitečné pro zacílení nebo řízení exprese sledovaných genů.

V rámci zlepšování rostlin transgenesí, je možno vázat pracovní postup takové nukleotidové promotorové sekvence se

29.03.00

sekvencí kódující sledovaný gen.

Nukleotidové konstrukce, s výhodou v podobě vektoru, je možno použít k transformaci rostlinných buněk stabilním způsobem takového druhu, že takto transformované rostliny obsahují ve svém genomu sledovaný gen spojený s promotorovou sekvencí podle vynálezu.

Zrna, která se vyvíjejí oplodňováním z této rostliny, obsahují rovněž ve svém genomu tento transgen.

Vzhledem k souvislosti s promotorovou sekvencí podle vynálezu se sledovaný transgen exprimuje pouze v oblasti albumenu obklopující klíček, tedy ve shora uvedených hustých cytoplasmových buňkách.

K expresi transgenu dochází v prvních dnech po opylení přesněji čtvrtého dne po opylení.

Promotorové sekvence podle vynálezu je možno volit ze souboru zahrnujícího sekvence SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5, 6 nebo 7 nebo všechny nukleotidové sekvence, které jsou jejich homology.

Sekvence SEQ ID No 1 odpovídá promotoru genu ESR1

Sekvence SEQ ID No 2 odpovídá promotoru genu ESR2

Sekvence SEQ ID No 3 odpovídá promotoru genu ESR3

Sekvence SEQ ID No 4 odpovídá promotoru genu ESR4

Sekvence SEQ ID No 5 odpovídá fragmentu 499 párů bází na SEQ ID No 2 (nukleotidům 1995-2493)

Sekvence SEQ ID No 6 odpovídá fragmentu 507 párů bází na SEQ

29.03.00

ID No 3 (nukleotidům 1202-1708)

Sekvence SEQ ID No 7 je konzenuální sekvencí 265 nukleotidů, získaná porovnáním mezi sekvencemi SEQ ID No 1, No 2 a No 3.

Označením "homologová nukleotidová sekvence" se rozumí všechny nukleotidové sekvence, které se liší od sekvence SEQ ID No 1, No 2, No 3, No 4, No 5, No 6 nebo No 7 substitucí, delecí a/nebo inzercí jednoho nebo několika nukleotidů v polohách, jakými homologové nukleotidové sekvence konzervují vlastnosti specifického promotoru sekvencí SEQ ID No 1 až No 7. S výhodou taková homologová nukleotidová sekvence obnáší alespoň 70 % sekvencí SEQ ID No 1 až No 7, s výhodou alespoň 80 % a ještě výhodněji alespoň 95 %.

Homologie je obecně určena použitím logiky analýsy sekvencí (například Sequence Analysis Software Package Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Podobné nukleotidové sekvence jsou seřazeny k získání maximálního stupně homologie (identity). K tomu může být nutno zavést do sekvence umělý způsob prostorů ("mezer"). Jakmile se uskuteční optimální seřazení, stanoví se stupeň homologie (například identity) zaznamenáním všech poloh, pro které jsou nukleotidy dvou porovnávaných sekvencí stejné, vzhledem k celkovému počtu poloh.

S výhodou taková homologová nukleotidová sekvence hybriduje specificky na komplementárních sekvencích sekvencí SEQ ID No 1 až No 7 za striktních podmínek. Parametry definující striktní podmínky závisejí na teplotě, při které se odděluje 50 % spárovaných větví (T_m).

U sekvencí obsahujících více než 30 bází, je teplota T_m definována vztahem:

29.03.00

$T_m = 81,5 + 0,41 (\%G+C) + 16,6 \text{ Log(koncentrace kationtů)} - 0,63 (\% \text{ formamidu}) - (600/\text{počet bází})$
(Sambrook a kol., Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press str. 9.54 až 9.62, 1989).

U sekvencí s délkou menší než 30 bází je teplota T_m definována vztahem $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Za vhodných striktních podmínek, při kterých se specifické sekvence nehybridují je teplota hybridizace přibližně 5 až 30 °C, s výhodou 5 až 10 °C pod T_m , a použitými hybridizačními pufry jsou s výhodou roztoky se zvýšenou iontovou silou jako je například roztok 6xSSC.

Různé nukleotidové sekvence podle vynálezu mohou být nebo nemusí být umělého původu. Může jít o sekvence ADN získané probírkou banky sekvencí za použití sond zpracovaných na základě sekvencí SEQ ID No 1 až No 7. Takové banky mohou být připraveny klasickými technikami molekulární biologie, známými pracovníkům v oboru.

Nukleotidové sekvence podle vynálezu mohou být rovněž připraveny chemickou cestou nebo smíšenými způsoby zahrnujícími chemickou nebo enzymatickou modifikaci sekvencí získaných probírkou bank.

Promotorové nukleotidové sekvence podle vynálezu jsou s výhodou sekvence izolované z obilnin, obzvláště z kukuřice.

Promotorové nukleotidové sekvence podle vynálezu mohou být obzvláště izolovány způsoby inverzní PCR nebo za použití genomů (Devic a kol., Plant Physiol. Biochem. 35: 35(4), str. 331 až 339, 1997).

Promotorové nukleotidové sekvence podle vynálezu mohou

29.03.00

naopak obsahovat nebo mohou být spojené s regulačním motivem cis CTACACCA opakovaným s výhodou za sebou nebo s docela jiným motivem obsahujícím jednu nebo několik degenerovaných bází majících stejnou funkci.

Vynález se týká také nukleotidové konstrukce nazývané expresní kazeta, obsahující jednu promotorovou nukleotidovou sekvenci, jako je sekvence uvedená shora, operativně vázanou na alespoň jeden sledovaný gen.

Sledovaný gen může být spojen s jinými regulačními prvky, jako jsou aktivátory a sekvence terminace transkripce (terminátory). Jako příklad je možno uvést jako terminátor použitelný v těchto konstrukcích zakončení 3' genu nopalinové syntházy *Agrobacterium tumefaciens*.

Sledovaný gen může například kódovat protein účastnící se na vývoji klíčku a/nebo albumenu, na buněčném růstu, na metabolismu cukrů (invertázy) a mastných kyselin, toku živin (transportérech). Může rovněž kódovat toxický protein, nebo ještě aktivační nebo inhibiční protein ostatních genů, jako je protein inhibující transkripční faktor (například domény regrese typu *engrailed* (Poole a kol. Cell 40, str. 37 až 43, 1989) nebo například korepresorů).

Podle výhodného způsobu kóduje sledovaný gen protein, jehož specifická exprese v zóně obklopující klíček by umožňovala ovlivňovat tvar klíčku a/nebo jeho vývoj. Například může takový gen kódovat barnázu nebo isopentenylovou transferázu.

Sledovaný gen může být umístěn ve směru nebo v proti směru.

Promotorová nukleotidová sekvence podle vynálezu může být také spojena s markerovým genem, například s genem umožňujícím selekci rostliny transformované od rostliny, která neobsahuje

29.03.00

cizí transfektovanou ADN. Jako markerový gen je možno uvést zejména gen vykazující odolnost vůči antibiotiku (Herrera-Estrella a kol., EMBO J. 2, str. 987 až 995, 1983) nebo odolnost vůči herbicidu (EP 242246).

Vynález se týká také nukleotidového vektoru, jako je plasmidový vektor, vhodný k transformaci hostitelských buněk, obsahující shora uvedenou expresní kazetu. Konstrukci expresních vektorů pro transformaci volí pracovník v oboru ze standardních způsobů.

Vynález se týká také hostitelské buňky krytosemenné rostliny, jmenovitě obilniny transformované vektorem podle vynálezu.

Vynález se také týká transgenní rostliny nebo části transgenní rostliny, jmenovitě semen, plodů a pylů vytvořených z takové buňky.

Jako buňky, schopné transformace způsobem podle vynálezu, se příkladně uvádějí buňky rostlin ve velkých kulturách (například kukuřice, pšenice, řepka, slunečnice, hrách, soja a ječmen) nebo zelinářské rostliny a květiny. Přednostně je možno volit rostliny, o nichž je známo, že obsahují velké zásoby (proteinové, glycidové a lipidové), zejména obilniny nebo rostliny olejnaté.

Hybridní rostliny získané křížením rostlin podle vynálezu, patří také do rozsahu vynálezu.

Vynález se týká také způsobu získávání krytosemenné rostliny vykazující zlepšené agronomické nebo nutriční kvality, přičemž se při způsobu:

- transformuje alespoň jedna buňka krytosemenné rostliny shora uvedeným vektorem,

29.03.00

- kultivuje se takto transformovaná buňka způsobem k vytvoření rostliny obsahující ve svém genomu expresní kazetu podle vynálezu.

Transformace rostlinných buněk se může realizovat způsoby známými pracovníkům v oboru.

Uvádějí se jmenovitě způsoby přímého transferu genů jako je mikroinjektování do klíčekidní (klíčky vytvářející) rostliny (Neuhaus a kol., 1987), infiltrace ve vakuu (Bechtold a kol., 1993) nebo elektroporace (Chupeau a kol., 1989) nebo také přímé vysrážení za použití PEG (Schocher a kol. 1986) nebo bombardování znovu nabytými částicemi sledované plasmidické ADN (Fromm a kol., 1990).

Je také možno naočkovat rostlinu bakteriálním kmenem, jmenovitě Agrobakteriem. Podle jednoho provádění způsobu podle vynálezu se rostlinné buňky transformují vektorem podle vynálezu, přičemž buněčný hostitel je schopen infikovat uvedené rostlinné buňky umožněním integrace do jejich genomu sledované nukleotidové sekvence původně obsažené v genomu dále uvedeného vektoru. S výhodou je používaným buněčným hostitelem Agrobacterium tumefaciens obzvláště způsobem, který popsal An a kol. (1986) nebo také Agrobacterium rhizogenes způsobem, který popsal Guerche a kol. (Mol. Gen. Genet. str. 206 až 328, 1987).

Například se může transformace rostlinných buněk provádět transferem oblasti T cirkulárního plasmidu extrachromosomového induktoru tumorů Ti Agrobacterium tumefaciens za použití binárního systému (Watson a kol. 1994). K tomu se sestaví dva vektory. V jednom z nich se delecí vypustí oblast T s výjimkou levého a pravého okraje, přičemž se markerový gen začlení mezi ně k umožnění selekce v buňkách rostlin. Druhým partnerem binárního systému je pomocný plasmid Ti, což je modifikovaný plasmid, který už nemá oblast T, ale obsahuje vždy geny virové

29.03.02

virulence potřebné k transformování rostlinné buňky.

Přednost se dává způsobu, který popsal Ishida a kol. (Nature Biotechnology 14, str. 745 až 750, 1996) k transformaci monoděložných rostlin.

Podle jiného protokolu se transformace provádí způsobem, který popsal Finer J. (Plant Cell Report. 11, str. 323 až 328, 1992) za použití bombardování částicemi wolframu nebo zlata.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nukleotidová promotorová izolovaná sekvence umožňující expresi kódujících sekvencí, na kterých je vázána, přičemž exprese je i) specifická pro oblast albumenu obklopující klíček v zrnech krytosemenných rostlin a ii) působí obzvláště v časných stádiích vývoje albumenu.

Ve skutečnosti je možno časnou akci a specifickou pro vývoj klíčkových tkání a albumenu nalézt: podle vzájemného tvaru jedné nebo druhé tkáně, bylo by možno získat zrna nebo plody obohacené škrobem (silný albumen) a/nebo olejem (silný klíček) cestou použití příslušných stimulačních genů (například hormonu buněčného cyklu) nebo inhibičních genů (například toxického proteinu nebo inhibitoru transkripce). Albuminy bez klíčků by bylo možno získat také podle tohoto modelu, pro průmyslové aplikace ve škrobárnách a mlýnech.

Například použití genů kódujících hormony (cytokiny, auxiny) buněčného cyklu za řízení promotorů podle vynálezu by umožňovalo modifikovat proces vzniku buněk a korelačním způsobem vývoj albumenu, jak popsal R.J. Scott (1998).

Působení, zaměřené na akumulaci živin v klíčku a v albumenu, může být rovněž hledáno v použití například jako určitých

29.03.03

genů, genů kodujících transportery živin (zejména cukrů) na rozhraní rostlina/albumen a albumen/klíček nebo geny kodující inhibitory těchto přenosů pro diferencovanou akumulaci živin v albumenu nebo v klíčku.

Vynález se týká také způsobu modifikace zemědělských a/nebo nutričních kvalit rostliny cíleným a časným působením na vývoj klíčku/albumenu použitím transformace rostlin vektorem podle vynálezu. Obzvláště se vynález týká modifikace tvaru a/nebo vývoje klíčků/albumenu. Poukazuje také na změny ve vývoji klíčku s cílem produkce zrn bez klíčků pro obiloviny zajímavé pro průmysl škrobáren a mlýnů.

Zvláště se vynález týká shora definované expresní kazety k získání krytozrnné rostliny vykazující zlepšené zemědělské nebo nutriční kvality. S výhodou může získaná transgenní rostlina produkovat zrna s upraveným obsahem škrobu nebo oleje v porovnání s rostlinhou netransformovanou.

Vynález se týká také použití transgenních rostlin získaných podle vynálezu nebo částí těchto rostlin, zejména semen, zrn a plodů pro přípravu odvozených produktů zejména potravinových.

Do rozsahu vynálezu patří také získané produkty, jako jsou olejnatá semena obohacená olejem, mouky ze semen obohacených škrobem nebo olejem.

Vynález se týká také veškerých složek lidské nebo zvířecí potravy připravených ze získaných produktů.

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení pomocí připojených schemat..

29.03.02

Seznam obrázků na výkresech

- Na obr. 1 je schema znázorňující etapy klonování promotoru ESR
- Na obr. 2 je restrikční obraz plasmidu L82/34 obsahujícího jmenovitě promotor pEsr1 napojený na Gus.
- Na obr. 3 je restrikční obraz plasmidu L124/19 obsahujícího jmenovitě promotor pEsr2 napojený na Gus.
- Na obr. 4 je restrikční obraz plasmidu L127a5 obsahujícího jmenovitě promotor pEsr3 napojený na Gus.
- Na obr. 5 je restrikční obraz plasmidu L78a1 obsahujícího jmenovitě promotor pEsr1 napojený na lpt.
- Na obr. 6 je restrikční obraz plasmidu L125a2 obsahujícího jmenovitě promotor pEsr2 napojený na lpt.
- Na obr. 7 je restrikční obraz plasmidu L77a101 obsahujícího jmenovitě promotor pEsr1 napojený na Barnase.
- Na obr. 8 je restrikční obraz plasmidu L126a3 obsahujícího jmenovitě promotor pEsr1 napojený na Barnase.
- Na obr. 9 je porovnání sekvencí promotorů genů Esr1, Esr2 a Esr3 (případně prEsr1, prEsr2 a prEsr3, nebo SEQ ID No 1, SEQ ID No 2 a SEQ ID No 3), přičemž konzervované části jsou seřazeny.
- Na obr. 10 je restrikční obraz plasmidu pWP280.
- Na obr. 11 je restrikční obraz plasmidu L129/46 obsahujícího zejména promotor pEsr2 napojený na sekvenci Esr2 v protisměru.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Kvantitativní exprese Esr1,2,3

Opsahl-Ferstad a kol. (The Plant J. 12, str. 235 až 246, 1997) umožnil identifikovat "diferenčním displejem" specifický amplikon albumenu Esra1 (číslo dostupnosti na bázi daných EMBL:

29.03.00

X98495) a izolovat tříděním genomových a komplementárních bank na linii hybridu HG5*HD7 (Barloy a kol., Maydica 34, str. 303 až 308, 1989) a linii A188 (Gerdes J.T. a Tracy W.F., Corp Sci. 33, str. 334 až 337, 1993) odpovídající klony. Z genomických sekvencí Esr1g1 (číslo dostupnosti na EMBL:X98497) a Esr2g1 (číslo dostupnosti na EMBL:X98499) a Esr3g2 (číslo dostupnosti na EMBL:X99970), bylo možno uvést ve známost zvláště tři geny Esr1, Esr2 a Esr3.

Autoři vynálezu vyhodnotili relativní příspěvky exprese každého z genů Esr díky zkušenostem RT-PCR, digesce enzymy restrikce a kvantifikace způsoby známými pracovníkům v oboru z materiálů JAP 7 a JAP 9 (dny po opylení "Jour Apres Pollinisation").

Kvantifikace různých identických skupin na migračním gelu ukazuje relativní střední příspěvky 18 %, 53 % a 29 % pro transkripty Esr1, Esr2 a Esr3. Promotor Esr2 tedy umožňuje kvantitativní expresi nejsilnější z genu, který řídí.

Příklad 2

Izolování a klonování promotorových sekvencí

Jak je znázorněno na obr. 1, byly fragmenty obsahující fáze otevřeného čtení Esr1, Esr2 a Esr3 (Opsahl-Ferstad H.D. a kol., The Plant J. 12, str.235 až 246, 1997) i sekvence v protisměru a po směru subklonovány v plasmidu pBluescript SK+ (Stratagene) způsobem, který popsal Sambrook a kol. (Molecular Cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Část pocházející z plasmidu L23/7 obsahující fragment Sall o 2,1 kb lambdaEsr1g1, plasmid L33/1 obsahující fragment BamHI o 3,4 kb lambdaEsr2g1, plasmid L33/10 obsahující fragment BamHI o 1,9 kb lambdaEsr2g1 a plasmid L102c24 obsahující fragment HindIII o 4,5 kb lambdaE1-111. Místa XbaI,

29.03.00

situovaná hned v protisměru otevřeného čtení (TCTGATTCCATG) umožnila rozlišit domnělé promotory příslušných fází otevřeného čtení. Zejména fragment Sall/XbaI o 0,53 kb L23/7 byl označen jako domnělý promotor Esr1, fragment HindIII/BamHI o 2,35 kb L33/1 (část v proti směru promotoru) a fragment BamHI/XbaI 0,14 o kb L33/10 (po směru promotoru), domnělého promotoru Esr2, fragment HindIII/XbaI 1,71 kb, domnělý promotor Esr3 a fragment XbaI/XbaI o 1,62 kb obsahující domnělý promotor Esr4. Funkční promotor Esr2 o 2,49 kb byl rekonstituován z fragmentu HindIII/BamHI o 2,35 kb L33/1 a fragmentu BamHI/XbaI o 0,14 kb L33/10 ze základního plasmidu typu pBSSK+ (Stratagene). Orientace šipkami na obr. 1 znamená orientaci 5' - 3'.

Příklad 3

Struktura sekvencí v protisměru genů Esr

Porovnání mezi sekvencemi oblastí 5' ukázalo dva typy homologie: jednu sekvenci vysoce konzervovanou, která odpovídá sekvenci, která se blíží k 265 párům bází a retrotranspozni sekvence v distální části. Ačkoli retrotranspozni sekvence jsou ve všech třech promotorech v různých orientacích a polohách, nezdá se, že hrají významnou úlohu v expresi genů Esr. V důsledku toho 265 párů bází by obsahovalo celou informaci cis potřebnou k expresi genů specifických pro oblast obklopující klíček.

Dohodnutá sekvence (SEQ ID No 7) se získá po seřazení tří promotorových nukleotidových sekvencí a použitím logického Sequenceru 3.1 společnosti Genes Codes Corporation (Ann. Arbor, MI 48106).

Degenerované báze jsou popsány v publikaci Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1985): Nomenclature for incompletely specified nucleic acid sequences.

29.03.02

European Journal of Biochemistry 150:1-5.

Zejména

B=C, G nebo T, ale nikoli A

D=A, G nebo T, ale nikoli C

H=A, C nebo T, ale nikoli G

K=G nebo T

M=A nebo C

N=G, A, T nebo C

R=G nebo A

S=C nebo G

V=A, C, nebo G, ale nikoli T

W=A nebo T

X=G, A, T nebo C a

Y=C nebo T,

Patrná je také homologie mezi sousedícími oblastmi, které zasahují do přibližně 500 párů bází mezi promotorem Esr2 a Esr3, jak jsou definovány v SEQ ID No 5 a No 6.

Přítomnost prvků činných v cis se volí ze souboru zahrnujícího konzervované sekvence, z nichž nejvýraznější je CTACACCA v tandemu právě 50 bází protisměrně otevřené fáze čtení (obr. 9). Tato sekvence je dobrým kandidátem stát se elementem zodpovědným za genovou expresi specifickou pro tkáň. První z tohoto opakování je ostatně umístěna v kruhu nejvýznamnějšího inverzního opakování nacházejícího se ve třech promotorech. Opakované sekvence plus dvakrát jsou konzervovány pouze mezi promotory pEsr2 a pEsr3 v oblasti s chybějícím promotorem Esr1: například sekvence ATTCT a TTTTA, potenciální usnadňovači transkripce vzhledem ke slabší expresi Esr1 (obr. 9) se opakují každá čtyřikrát.

K předvedení funkčnosti elementů cis se připraví konstrukty obsahující nukleotidové promotorové oddělené sekvence napojené na GUS.

29.03.02

Jako příklad k vytvoření delece promotoru Esr2 se použije dvou technik:

- extensivní delecí 5' až 3' na fragmentu HindIII-XbaI pomocí kitu Erase-a-base™ od Promega (konstrukce L140),
- zesílením PCR fragmentů promotoru (konstrukce L194).

Plasmidy L140 a L194 obsahují oddělené promotory Esr2 napojené na referenční Gus a terminátor technikou popsanou v následujícím příkladu.

Pro transformační etapu se fragmenty obsahující konstrukty "oddělených promotorů Esr2-Gusa-ter" transferují do jiného plasmidu obsahujícího konstrukt "promotoru ubiquitin-lucifera-se-ter", který slouží jako interní standard pro kvalifikování aktivity Gus a ke korigování účinku polohy inserce transgenu do genomu pod expresí, proměnlivé u různých rostlin.

V následující tabulce I jsou fragmenty promotoru Esr2 pocházejícího z těchto delecí.

Tabulka I

Technika zvolené delece Fragment zbylý z promotoru Esr2*

Digesční kit (L140)	985-2493
	1254-2493
	1865-2493
	1874-2493
	1880-2493
	2077-2493
Zesílení PCR (L194)	2163-2493
	2275-2493
	2373-2493

* Očíslování promotoru Esr2 je založeno na sekvenci pEsr2

29.03.02

uvedené v dodatku (SEQ ID No 2), která pochází z HindIII (AAAGCTT nebo A=poloha 1) na XbaI(TCTAGA nebo A=poloha 2493).

K předvedení funkčnosti shora popsaných pomocných nukleotidových sekvencí je autoři klonovali v protisměru raportního genu GUS a získaných konstruktů použili k transformaci rostlin.

Výhodně se získají deletované promotory Esr2 podle následujících protokolů.

Předně se provedou delece 5' na 3' pomocí exonukleázy III. Plasmid L124/19 obsahující promotor genu Esr2 napojený na gen β -glukuronidázy popsanou v příkladu 4.1 se digeruje Hind III k vytvoření místa iniciace delece a pomocí PstI k vytvoření ochranného místa proti působení exonukleázy III. Delece se provedou za použití kitu Erase-a-baseTM (Promega).

Za druhé se promotory zesílí pomocí amorce ESRX (5' GGGGTCTAGACTGTGAAGCTATTTTCCA3') (SEQ ID No 8)) obsahující restriční místo (XbaI (podtržené) a ESRH1 (5' GGGGAAGCTTTACATTCTTGCCATAACATA3' (SEQ ID No 9)), ESRH2 (5' GGGGAAGCTTTTCATCAATAATGCCTCATT3' (SEQ ID No 10)), ESRH3 (5' GGGGAAGCTTTAATTTCTTACTTCCTATCT3' (SEQ ID No 11)) obsahující restriční místo Hind III (podtržené). Produkty zesílení digerované XbaI a HindIII nahradí celkový promotor Esr2 protisměrně genu β -glukuronidázy v plasmidu L124/19.

Spojené deletované promotory na genu β -glukuronidázy se pak klonují do plasmidu obsahujícího gen luciferázy pod kontrolou promotoru aktinu rýže. Ten se získá klonováním fragmentu XhoI/NcoI plasmidu pAct1-F4 (Mc Elroy D. a kol., Mol. Gen. Genet. 231, str. 150 až 160, 1991) odpovídajícího promotoru a prvnímu intronu aktinu rýže v plasmidu typu pGP214 obsahujícího gen luciferázy a terminátor nopalínové syntázy (Twell D. a

29.03.02

kol., Development 109, str. 705 až 713, 1990) digerované Sall/ NcoI. Adaptor obsahující místa restrikce Sall a NotI, vytvořené nukleotidy 5'GGCCAGTCGACAAAGCGGCCGCATGCA3' (SEQ ID No 12) a 5'TCAGCTGTTTCGCCGGCGT3' (SEQ ID No 13) se zavede do získaného plasmidu digerovaného NotI a PstI (plasmidu L210). Fragменты Sall/NotI obsahující deletované promotory spojené s genem β -glukuronidázy se klonují do plasmidu L210 digerovaného Sall a NotI.

Příklad 4

Příprava chimerních konstruktů

Všechny konstrukty se mohou realizovat zvláště způsoby, které popsal Sambrook a kol. (Molecular Cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Adaptátory, kterých je možno použít jako příkladu pro klonování těchto fragmentů v protisměru různých ovlivňujících genů, jsou popsány v restričních plánech odpovídajících plasmidů.

4-1 Chimerní konstrukty GUS

Plasmid L23/7 (Esr1) se deletuje z fragmentu SacI obsahujícího místa nežádoucí restrikce. Pak se zavede fragment XbaI/EcoRI s 2164 páry bází plasmidu pB1101 (Jefferson a kol., Plant Nuclear Biology Reporter 5 (4), str. 387 až 405, 1987) obsahujícího gen Gus (kodující β -glukuronidázu avšak zbavený promotoru) a koncová sekvence nos. Takto vytvořený nový plasmid a tedy digerovaný XhoI a produkt digesce obsahující podpůrnou oblast napojenou na gen Gus a umístěnou proti jeho směru se subklonují do vektoru pBCKS+ (Stratagene) tak, aby promotor byl v blízkosti hybridizační zóny iniciátoru T7 umožňující tak získat plasmid L82/34 (obr. 2, tabulka II).

Podle podobného protokolu a s indikovanými restričními

29.03.02

enzymy podle obrázků je možno získat plasmidy L124/19 (pEsr2-GUS, obr. 3, tabulka III) a L127a5 (pEsr3-GUS, obr. 4, tabulka IV).

Je rovněž možno použít jiných raporterových genů nahražením GUS například GFP (Green Fluorescent Protein, Siemering K. R. a kol., Current Biology 6, str.1653 až 1663, 1996) k potvrzení získaných výsledků s GUS.

Podle právě popsaného podobného protokolu se napojí fragment HindIII-XbaI promotoru pEsr2 na sekvenci kodující GFP.

Tabulka II

Charakteristiky plasmidu L82/34

Fragment	Poloha	Odkaz
pEsr1	741-1272	
Gus	1302-3107	
ter nos	3181-3434	
cat	5878-5223	
pBCKS+	1-740	Stratagene
L23/7 (pEsr1)	741-1272	Opsahl-Ferstad et al, 1997* a podle příkladu
pBI101	1273-3436	Jefferson et al, 1987
L23/7 (proti směru)	3437-3763	Opsahl-Ferstad et al, 1997 a podle příkladu
pBSSK+	3764-3769	Stratagene
pBCKS+	3770-6428	Stratagene

* insert odpovídá fragmentu Esr1g1 vyznačenému na obr. 4 podle Opsahl-Ferstada a kol. (The Plant J. 12, str. 235 až 246, 1997).

29.03.02

Tabulka III

Charakteristiky plasmidu L124/19

Fragment	Poloha	Odkaz
pEsr2	689-3175	
Gus	3205-5010	
ter nos	5084-5337	
bla	7441-6584	
pBSSK+	1-674	Stratagene
Linker JFB 34	675-688	podle příkladu ¹⁾
L33/1 (pEsr2')	689-3037	podle příkladu**
L33/10 (pEsr2'')	3038-3175	Opsahl-Ferstad et al, 1997 a podle příkladu**
pBI101	3176-5339	Jefferson et al, 1987
linker JFB56	5340-5346	podle příkladu ²⁾
pBSSK+	5347-7566	Stratagene

** inserty jsou uvedeny částečně jako fragment Esr2g1 na obr. 4 podle Opsahl-Ferstada a kol. (The Plant J. 12, str. 235 až 246, 1997).

1) adaptor JFB34: 5' TCGACTGCAGCCCA 3' (SEQ ID n° 14)

3' GACGTCGGGTTCGA 5' (SEQ ID n° 15)

2) adaptor JFB56: 5' CTAGACCCGAATTCGC 3' (SEQ ID n° 16)

3' TGGGCTTAAGCGCCGG 5' (SEQ ID n° 17)

Tabulka IV

Charakteristiky plasmidu L127a5

Fragment	Poloha	Odkaz
pEsr3	689-2390	
Gus	2420-4225	
ter nos	4229-4552	
bla	6656-5799	
Pbssk+	1-674	Stratagene
Linker JFB 34	675-688	podle příkladu
L102c24 (pEsr3)	689-2390	podle příkladu
pBI101	2391-4554	Jefferson et al, 1987
linker JFB56	4555-4561	podle příkladu
pBSSK+	4562-6781	Stratagene

29.03.00

4-2 Chimerní konstrukty lpt

Gen kodu lpt pro isopentenyltransferázu, který je jedním z enzymů aplikovaných při syntese cytokininu, je fytohormon mající úlohu v buněčném růstu rostlin. Sekvenci genu stanovil Heidekamp F. a kol. (Nucl. Acids Res. 11, str. 611 až 6223, 1983). Další práce ukázaly, že tato sekvence za řízení jedním specifickým promotorem klíčku by umožnila zvýšit obsah v sušině rajčete (Martineau B. a kol., 1995).

Popsaným způsobem klonování a s fragmenty nukleových kyselin a restričních enzymů, vyznačených na odpovídajících obrázcích, mohly být připraveny konstrukty pEsr1-lpt (obr. 5, tabulka V) a pEsr2.lpt (obr. 6, tabulka VI). Rovněž je možno získat konstrukt pEsr3-lpt podle stejného protokolu. Pro přípravu těchto konstruktů bylo použito místo míst XbaI, míst NcoI (CCATGG) přecházejících kodon ATG od začátku fáze otevřeného čtení.

Tabulka V

Charakteristiky plasmidu L78a1

Fragment	Poloha	Odkaz
pEsr1	310-844	
ipt	846-1565	
ter ipt	1566-1850	
bla	2963-3823	
pUC118	1-231	Boehringer Opsahl-Ferstad et al, 1997 et cet exemple Zhang et al, 1996 Zhang et al, 1995 Boehringer
L23/7 (pEsr1)	232-844	
přesná mutace	845	
pRZ1	846-1883	
pUC118	1884-4763	

29.03.02

Tabulka VI

Charakteristiky plasmidu L125a2

Fragment	Poloha	Odkaz
pEsr2	689-3183	
ipt	3185-3904	
ter ipt	3905-4189	
bla	6309-5449	
pBSSK+	1-674	Stratagene
Linker JFB 34	675-688	podle příkladu
L33/1 (pEsr2')	689-3037	podle příkladu
L33/10 (pEsr2'')	3038-3183	Opsahl-Ferstad et al, 1997 a podle příkladu
přesná mutace	3184	Zhang et al, 1996
pRZ1	3185-4198	Zhang et al, 1995
adaptateur JFB56	4199-4214	podle příkladu
pBSSK+	4215-6434	Stratagene

4-3 Chimerní konstrukty barnázy

Barnázový gen koduje RNázu. Tento gen byl izolován pomocí *Bacillus amyloliquefaciens* (Hartley a kol., J. Mol. Biol. 202, str. 913 až 915, 1988). Jeho použití k vytvoření mužských sterilních rostlin je popsáno v evropském patentovém spise číslo EP 344 029 (Mariani a kol., 1990).

V rámci vynálezu byly získány plasmidy L77a101 (pEsr1-barnázy) a L126a3 (pEsr2-barnázy) popsané na obr. 7 (tabulka VII) a ba obr. 8 (tabulka VIII) z plasmidu "promotoru A6-barnázy" popsaného ve WO 92/11379 nahražením pA6 promotory pEsr1 a pEsr2 technikou známou pracovníkům v oboru.

Je také možno získat konstrukt pEsr3-Barnáza podle podobného protokolu.

29.03.02

Tabulka VII

Charakteristiky plasmidu L77a101

Fragment	Poloha	Odkaz
pEsr1	80-605	
Barnase	613-945	
ter CaMV	1571-2257	
bla	4324-3467	
pA3	I-28	Scott et al, 1992
L23/7 (pEsr1)	29-605	Opsahl-Ferstad et al, 1997 a podle příkladu
pA3	606-4473	Scott et al, 1992

Tabulka VIII

Charakteristiky plasmidu L126a3

Fragment	Poloha	Odkaz
pEsr2	43-2529	
Barnase	2537-2869	
ter CaMV	3495-4181	
bla	6248-5391	
pA3	I-28	Scott et al, 1992
linker JFB34	29-42	podle příkladu
L33/1 (pEsr2')	43-2391	podle příkladu
L33/10 (pEsr2'')	2392-2529	Opsahl-Ferstad et al, 1997 a podle příkladu
pA3	2530-6397	Scott et al, 1992

4-4 Chimerní konstrukt antiEsr2

Rekonstituovaný funkční promotor Esr2 (2,49 kb), popsany v příkladu 2 a volený přednostně se zřetelem k výsledkům kvantitativní exprese, popsaným v příkladu 1, se nafúzuje na sekvenci Esr2g2 (Opsahl-Ferstad H.D. a kol., The Plant.J. 12, str. 235 až 246, 1997) vzatou v protisměru, jež je sama nafuzovaná na terminátor Nos.

Následujícím protokolem se s výhodou získá chimerní

29.03.02

konstrukt obsahující gen Esr2 v protisměru za řízení jeho čistým promotorem.

Do plasmidu odvozeného z pJIT30 obsahujícího promotor 35S se mezi místa BamHI a EcoRI začlení mnohočetné místo klonování a koncová sekvence viru mozaiky zelí (Guerineau F. a kol., Plant. Mol. Biol. 15, str. 127 až 136, 1990), adaptér obsahující místo SpeI a tvořený oligonukleotidy (5' GATCCACTAGTCCCG (SEQ ID No 18) a (5' AATTCGGGACTAGTG (SEQ ID No 19). Fragment EcoRI/SpeI plasmidu L42a14 (Opsahl-Ferstad H.D. a kol., The Plant. J. 12, str. 235 až 246, 1997)) se začlení do shora popsaného plasmidu. Takto získaná konstrukce obsahuje gen Esr2 v protisměrné orientaci za řízení promotorem 35S (plasmid L79b5).

Promotor 35S se zatlačí do plasmidu L79b5 restrikcí SacI a HindIII nahradí se adaptérem obsahujícím restrikční místa HindIII a NotI a tvořená oligonukleotidy (5' AAGCTTTTTGCGGCCGC (SEQ ID No 20) a (5' TCGAGCGGCCGCAAAAAGCTTAGCT (SEQ ID No 21)). Do tohoto adapteru se zavede promotor Esr2 ve formě fragmentu HindIII/NotI 2,44 kb. Takto získaná konstrukce obsahuje gen Esr2 v protisměrné orientaci za řízení jeho vlastním promotorem (plasmid L129/46 (obr. 11).

Podobným protokolem je možno získat konstrukty obsahující promotor Esr2 navázaný na protisměrnou sekvenci Esr1 a Esr3. Je také možno získat stejný typ chimerních konstruktů s jinými promotory Esr podle vynálezu. Získají se rovněž konstrukty obsahující konstitutivní promotor 35S, navázaný na protisměrnou shora popsanou sekvenci Esr.

Příklad 5

Získání transgenních rostlin (nutnost stabilní transformace kukuřice)

29.03.00

Zkušenosti s transnitní expresí používající transformaci bombardováním rostlinných buněk chimerními konstrukty pEsr-GUS a konstrukčním promotorem Gus, nedávaly výsledky ukazující specifickou exprese testovaných promotorů: nebyla pozorována žádná aktivita v zóně definované buňkami Esr. Malé rozměry této zóny a ostatních vlastních součástí mohly vysvětlovat skutečnost, že technika není přizpůsobena ve standardních podmínkách transnitní expresi. Jako příklad jsou sledované konstitutivní testované promotory aktinu rýže (McElroy a kol., 1992), ubiquitinu kukuřice (Christensen a kol., Transgenic Res. 5, str. 213, 1996), Adh kukuřice (Denis a kol., Nucl. Ac. Res. 12, str. 3983 až 4000, 1984) a 35S (Odell a kol., Nature 313, str. 810 až 812, 1985) zavádějící modré zabarvení do plného albumenu, což ukazovalo funkčnost transformačního systému, avšak nikoli v zóně obklopující klíček, což potvrzuje nepřizpůsobení systému na tuto zónu.

K transformaci zaměřené na stabilní expresi bylo tedy nutno studovat specifickou exprese promotorů podle vynálezu.

5-1 Bombardování částicemi

Způsob spočívá v použití bombardování částicemi stejnými jaké popsal J.Finer (Plant Cell Report 11, str. 323 až 328, 1992). Cílovými buňkami jsou buňky indiferentní k rychlému dělení mající zakonzervovanou schopnost regenerace celých rostlin. Tento typ buněk tvoří klíčkotvorný kalus kukuřice (nazývaný typ II). Kalusy se získají z nezralých klíčků genotypu HiII způsobem a v prostředí, které popsal Armstrong (Maize Handbook: nakladatelé M. Freeling, V.Walbot, str. 665 až 671, 1994). Tyto fragmenty kalusů o povrchu 10 až 20 mm² se čtyři hodiny před bombardováním uloží v množství 16 fragmentů na misku do Petriho misek obsahujících kultivační prostředí identické s iniciačním prostředím s přísadou 0,2 M manitolu + 0,2 M sorbitolu. Plasmidy, popsané v předchozích příkladech a ne-

29.03.02

soucí zaváděcí geny, se čistí na sloupci Qiagen^R podle instrukcí výrobce. Pak se vysrážejí na částicích wolframu (M10) podle Kleinova protokolu (Nature 327, str. 70 až 73, 1987). Takto obalené částice se vrhají na cílové buňky dělem podle protokolu, který popsal J. Finer (Finer J. Plant Cell Report. 11, str. 323 až 328, 1992). Misky s takto bombardovanými kalusy se pak zalijí prostředkem Scellofrais^R, načež se kultivují ve tmě při teplotě 27 °C. K prvnímu přepichování dojde po 24 hodinách, pak vždy po 15 dnech během tří měsíců ve stejném výchozím prostředí s přísadou selektivního činidla. Po třech měsících nebo někdy dříve, se získají kalusy, jejichž růstu nebylo bráněno selektivním činidlem, obvykle a hlavně sestávajícím z buněk pocházejících z dělení buňky, do jejíhož genetického prostředí bylo integrováno několik kopií selekčního genu. Frekvence získávání takových kalusů je přibližně 0,8 kalusu na bombardovanou misku.

Kalusy se identifikují, rozjednotí, zesílí a pak se kultivují k regeneraci rostlin za modifikace hormonální a osmotické rovnováhy buněk způsobem který popsal Vain a kol. (Plant Cell Tissue and Organ Culture 18, str. 143 až 151, 1989). Tyto rostliny se aklimatizují ve skleníku nebo se mohou křížit k získání samosprašných hybridů.

5-2. Transformace agrobakteriem

Jinou technikou transformace, použitelnou v rámci vynálezu, je použití *Agrobacterium tumefaciens* podle protokolu, který popsal Ishida a kol. (Nature Biotechnology 14, str. 745 až 750, 1996), zvláště na nezralých klíčcích deset dní po oplodnění. Všechna používaná prostředí jsou popsána v citované literatuře. Transformace začíná s fází společné kultury, kde jsou nezralé klíčky kukuřice uvedeny do styku na pět 5 minut s *Agrobacteriem tumefaciens* LBA 4404 obsahujícím superbinární vektory. Superbinární plasmid je výsledkem homologové rekombi-

29.03.00

nace mezi intermediárním vektorem nesoucím ADN-T obsahujícím sledovaný gen a/nebo selekční marker odvozený z plasmidů popsaných v předchozích příkladech a vektor pSB1 japonského tabáku (evropský patentový spis číslo EP 672 752), který obsahuje: geny *virB* a *virG* plasmidu pTiBo542 obsažené v supervirulentní vrstvě A281 *Agrobacterium tumefaciens* (ATCC 37349) a homologickou oblast nacházející se v intermediárním vektoru umožňující tuto homologickou rekombinaci. Klíčky se pak uloží na tři dny do prostředí LSAs ve tmě při teplotě 25 °C. K první selekci dojde na transformovaných kalusech: klíčogenní kalusy se přenesou do prostředí LSD5 obsahujícího 5 mg/l fosfinotricinu a cefotaximu 250 mg/l (vyloučení nebo omezení kontaminace *Agrobacteriem tumefaciens*). Tato etapa probíhá dva týdny za tmy při teplotě 25 °C. Druhá etapa selekce se provádí přenesením klíčků, které se vyvinuly v prostředí LSD5 do prostředí LSD10 (fosfinotricin 10 mg/ml) v přítomnosti cefotaximu, během tří týdnů za stejných podmínek jako prve. Třetí etapa spočívá ve vyříznutí kalusů typu I (fragmenty 1 až 2 mm) a přenesení na tři týdny ve tmě při teplotě 25 °C do prostředí LSD10 v přítomnosti cefotaximu.

Regenerace rostlinek se provede vyříznutím kalusů typu I, které prolifерují a jejich přenesním do prostředí LSZ v přítomnosti 5 mg/l fosfinotricinu a cefotaximu na dva týdny při teplotě 22 °C za trvalého osvětlení.

Regenerované rostlinky se přenesou do prostředí RM+G2 obsahujícího 100 mg/l Augmentinu na dva týdny při teplotě 22 °C za trvalého osvětlení k vývojové etapě. Získané rostliny se pak přenesou do fytotronu k jejich aklimatizaci.

5-3 Způsob vhodný pro barnasové konstrukty: retransformace kalusů act-barstar

Chimerních barnasových konstruktů popsaných v příkladu 3

29.03.02

se může využít ke klasické transformaci jedním nebo druhým shora popsaným způsobem.

Podle jednoho výhodného způsobu přizpůsobeného toxickému charakteru barnasy se používá k transformaci předběžně transformovaných kalusů obsahujících barstarový gen, který koduje specifický inhibitor Barnasy (Hartley a kol., J. Mol. Biol. 202, str. 913 až 915, 1988). Tento gen slouží jako "ochrana" během procesu regenerace těchto kalusů, který probíhá v podstatě z klíčkové genyze kukuřice.

Etapa a: získání linie exprimující barstar a plasmid obsahující gen resistentní k hygromycinu:

První etapa transformace probíhá podle popsaných protokolů s plasmidem pWP280 obsahujícím kazetu pActin-intron-Barstar-Nos poly A.

Tato kazeta se získá v těchto stupních: barnasový fragment se aplikuje pomocí PCR z plasmidu pTG2 (Horovitz a kol., J. Mol. Biol. 216, str. 1031 až 1044, 1990), pak se subklonuje až fragment Xba1/HindIII v plasmidu pBluescript KS+ (Stratagene) poskytující plasmid pWP118.

Barstarový gen se pak transfektuje na fragment Xba1/HincII v místě Xba1/SmaI plasmidu pW90, odvozeného z plasmidu pJIT30 (Guerineau a kol., Plant. Mol. Biol. 15, str. 127 až 136, 1990) (promotor 35SCaMV nahražený dvojitým promotorem 35S a oblastí polyspojovník mezi místy Xba1 a EcoRI nahraženými místy SpeI, BamHI, SmaI a PstI).

Oblast polyA CaMV získaného plasmidu se nahradí oblastí nos polyA pED23 (Dale a kol., Gene 91, str. 79 až 85, 1991) tvořící plasmid pWP266. Dvojitá promotorová oblast 35S CaMV se nakonec nahradí aktinovým promotorem rýže a intronem z pCOR113 (McElroy a kol., Mol. Gen. Genet. 231, str. 150 až 160, 1991)

29.03.02

tvořícím plasmid pWP280 (obr. 10).

Takto získané rostliny "promotor aktin-barstar" se analyzují způsobem Northern Blot k identifikování rostlin exprimujících korektně ARNm kodující Barstar. Rostliny takto vyrobené poskytují klíčky exprimující gen Barstar použitelné k produkci kalusů typu II známými způsoby: zavedením do kultury klíčků v indukčním prostředí kalogenese a přepichováním v selektivním prostředí obsahujícím hydromycin.

Etapa b: transformace těchto kalusů chimerním konstruktem barnasy:

Kalusy act-barstar získané v předchozí etapě se bombardují způsobem popsáným v odstavci 5-1 prve popsanými konstrukty "promotor Esr-barnas" plasmidem dodávajícím odolnost Basta (pDM302, McElroy a kol., Mol. Gen. Genet. 231, str. 150 až 160, 1991). Pak se oba geny oddělí souproutně segregací k získání samotného promotorového konstruktu Esr-barnase.

V porovnání s klasickým způsobem, který je zaměřen na přímé transformování kalusů konstruktem "Esr-barnase" se dosáhne výhodným způsobem nejlepších výsledků, zejména pokud jde o účinnost transformace a počet regenerovaných rostlin.

Příklad 6

Zavedení funkčnosti pomocných sekvencí (případ konstruktů GUS)

Ke zjišťování aktivity β -glukuronidázy se sklídí kukuřičná zrna z rostlin transformovaných bombardováním částicemi v přesných stadiích vývoje a podélně se rozříznou. Inkubují se v přítomnosti 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glukuronové kyseliny (X-GlcA, Duchefa) 24 hodin při teplotě 37 °C (Jefferson a kol., Plant Nuclear Biology Reporter 5 (4), str. 387 až 405, 1987).

29.03.02

Zvláště v případě konstruktu Esr2-Gus je modré zabarvení omezeno na obrys embrya 4. a 5. dne po opylení, pak pouze na úrovni suspensoru 6. a 7. dne a nakonec na spodině suspensoru ve dnech 9, 12, 13 a 15.

Tyto výsledky exprese v transgenních rostlinách ukazují, že fragmenty 5' popsané ve vynálezu odpovídají funkčním promotorům, a že jsou postačující pro správnou prostoro-časovou expresi, v souhlasu s dosavadními výsledky (Opsahal-Ferstad H.D. a kol. The Plant J. 12, str. 235 až 246, 1997).

Použití těchto pomocných nukleových sekvencí v molekulárních konstrukcích určených ke zlepšení kvality zemědělské, potravinové nebo průmyslové rostliny je obzvláště zajímavé pro modifikování tvaru klíčku a nebo albumenu a jeho vývoje.

Průmyslová využitelnost

Modifikace potravinářských a průmyslových rostlin ke zvýšení jejich užitkovosti, zvláště obsahu škrobu nebo oleje.


JUDr. Petr Chaloupek
advokát

SPOLÉČNÁ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETECKÁ ZÁKLADY JUD. PETRA KALENSKÉHO
A PARTNERŮ
120 00 Praha 2, Hálkova 2
Česká republika

Literatura

- Armstrong, Maize Handbook. nakladatelé Freeling M. Walbot V. Eds., str. 665 až 671, 1994.
- Barloy D. a kol., Maydica 34, str. 303 až 308, 1989.
- Becker H.A. a kol., Domains of gene expression in developing endosperm str. 361 až 375, 1999.
- Breton C. a kol., Plant Mol. Biol. 27, str. 105 až 113, 1995.
- Christensen a kol., Transgenic Res. 5, str. 213, 1996.
- Clark J.K. a Sheridan W.F., J. Heredity 77, str. 83 až 92, 1986.
- Dale a kol., Gene 91, str. 79 až 85, 1990.
- Dabis R.W. a kol., Can. J. Biol. 68, str. 471 až 479, 1990.
- Dennis, Nucl. Ac. Res. 12, str. 3983 až 4000, 1984.
- Devic a kol., Plant Physiol. Biochem. 35, str. 35(4):331 až 339, 1997.
- Finer J., Plant Cell Report. 11, str. 323 až 328, 1992.
- Gerdes J.T. a Tracy W.F., Crop Sci. 33, str. 334 až 337, 1993.
- Guerche a kol., Mol. Gen. Genet. str. 206 až 382, 1987.
- Guerineau a kol., Plant. Mol. Biol. 15, str. 127 až 136, 1990.
- Hartley a kol., J. Mod. Biol. 202, str. 913 až 915, 1988.
- Heidekamp F. a kol., Nucl. Acids Res. 11 str. 6211 až 6223, 1983.
- Horovitz a kol., J. Mol. Biol. 216, str. 1031 až 1044, 1990.
- Hu a kol., Molecular and General Genetics 248, str. 471 až 480, 1995.
- Hueros G. a kol., Plant Cell. 7, str. 747 až 757, 1995.
- Ishida a kol., Nature Biotechnology 14, str. 745 až 750, 1996.
- Jefferson a kol., Plant Nuclear Biology Reporter 5 (4), str. 387 až 405, 1987.
- Klein, Nature 327, str. 70 až 73, 1987.
- Kowles R.V. a Phillips R.L., Int. Rev Cytol. 112, str. 97 až 136, 1988.
- Kyle D.J. a Styles E.D., Planta 137, str. 185 až 193, 1977.
- Liang P. a Pardee A.B., Science 257, str 967 až 971, 1992.
- Lopes M.A. a Larkins B.A., Plant Cell. 5, str. 1383 až 1399,

29.03.00

1993.

Mariani a kol., Nature 347, str. 737 až 741, 1990.

McElroy a kol., Mol.Gen.Genet. 231, str. 150 až 160, 1991.

McElroy a kol., Plant Cell. 2, str. 163 až 171, 1990.

Odell a kol., Nature 313, str. 810 až 812, 1985.

Opsahl-Ferstad H.D. a kol., The Plant J. 12, str. 235 až 246, 1997.

Poole a kol., Cell 40, str. 37 až 43, 1985.

Sambrook a kol., Molecular Cloning- A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schel J.H.N. a kol., Can. J. Bot. 62, str. 2842 až 2856, 1984.

Scott a kol., světový patentový spis číslo WO 92/11379, 1992.

Siemering K.R. a kol., Current Biology 6, str. 1653 až 1663, 1996.

Twell D. a kol., Development 109, str. 705 až 713, (1990).

Vain a kol. Plant Cell Tissue and Organ Culture 18, str. 143 až 151, 1989.

Xu J. a kol., Plant Physiol. 108, str. 1293 až 1294, 1995.

Zhang a kol., The effect of auxin on cytokinin levels and metabolism in transgenic tobacco tissue an ipt gene. Planta 196, str. 84 až 94, 1995.

Zhang a kol. Expression of the isopentyl transferase gene is regulated by auxin in transgenic tobacco tissues. Transgenic Res. 5, str. 57 až 65, 1996.

- 29 -
37

29.03.02

PV2002-1139

P A T E N T O V É N Á R O K Y

24649

1. Nukleotidová promotorová izolovaná sekvence umožňující expresi kódujících sekvencí, na kterých je vázána, přičemž exprese je i) specifická pro oblast albumenu obklopující klíček v zrnech krytosemenných rostlin a ii) působí obzvláště v časných stadiích vývoje albumenu.
2. Nukleotidová promotorová izolovaná sekvence podle nároku 1, izolovaná z obilovin, zvláště z kukuřice.
3. Nukleotidová promotorová izolovaná sekvence podle nároku 1 nebo 2, obsahující sekvence SEQ ID No 1, No 2, No 3, No 4, No 5 No 6 nebo No 7 nebo všechny jejich homologové sekvence.
4. Nukleotidová promotorová izolovaná sekvence podle nároku 1 až 3, obsahující regulační element cis definovaný motivem CTACACCA opakovaným s výhodou za sebou.
5. Expresní kazeta v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje promotorovou nukleotidovou sekvenci podle nároku 1 až 4, vázanou operativně na alespoň jeden sledovaný gen.
6. Expresní kazeta podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sledovaný gen kóduje protein volený ze souboru proteinů účastnících se ve vývoji klíčku nebo albumenu, buněčného růstu, metabolismu cukrů nebo mastných kyselin, toxického proteinu a proteinu inhibujícího transkripci.
7. Expresní kazeta podle nároku 5 nebo 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že sledovaný gen kóduje protein volený mezi barnásou a isopentenyltransferázou.
8. Expresní vektor, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje expresní kazetu podle nároku 5 až 7.

29.03.02

9. Hostitelská buňka krytosemenné rostliny, zejména obilniny transformovaná vektorem podle nároku 8.

10. Transgenní rostlina nebo část této rostliny, zejména ovoce, semen, zrn, pyly, vzniklé z buňky podle nároku 9.

11. Rostlina nebo část rostliny podle nároku 10 ze souboru zahrnujícího obilovinu nebo rostlinu olejnatou, volenou ze souboru zahrnujícího pšenici, řepku, slunečnici a především kukuřici.

12. Hybridní transgenní rostlina získaná křížením rostlin podle nároku 10 nebo 11.

13. Způsob získávání krytosemenné rostliny se zlepšenými zemědělskými nebo nutričními vlastnostmi, v y z n a č u j í - c í s e t í m, že se

- transformuje alespoň jedna buňka krytosemenné rostliny vektorem podle nároku 8,
- kultivuje se takto transformovaná buňka způsobem k vytvoření rostliny obsahující ve svém genomu expresní kazetu podle nároku 5 až 7.

14. Použití expresní kazety podle 5 až 7 k získání transgenní krytosemenné rostliny se zlepšenými zemědělskými nebo nutričními vlastnostmi.

15. Použití podle nároku 14 k získání transgenní rostliny produkující zrna obsahující škrob nebo olej modifikovaná v porovnání s netransformovanou rostlinou.

16. Použití rostliny nebo části rostliny jmenovitě semene, zrna nebo plodu podle nároku 10 až 12 k přípravě odvozených produktů, zejména potravinářských.


JUDr. Petr Václavský
advokát

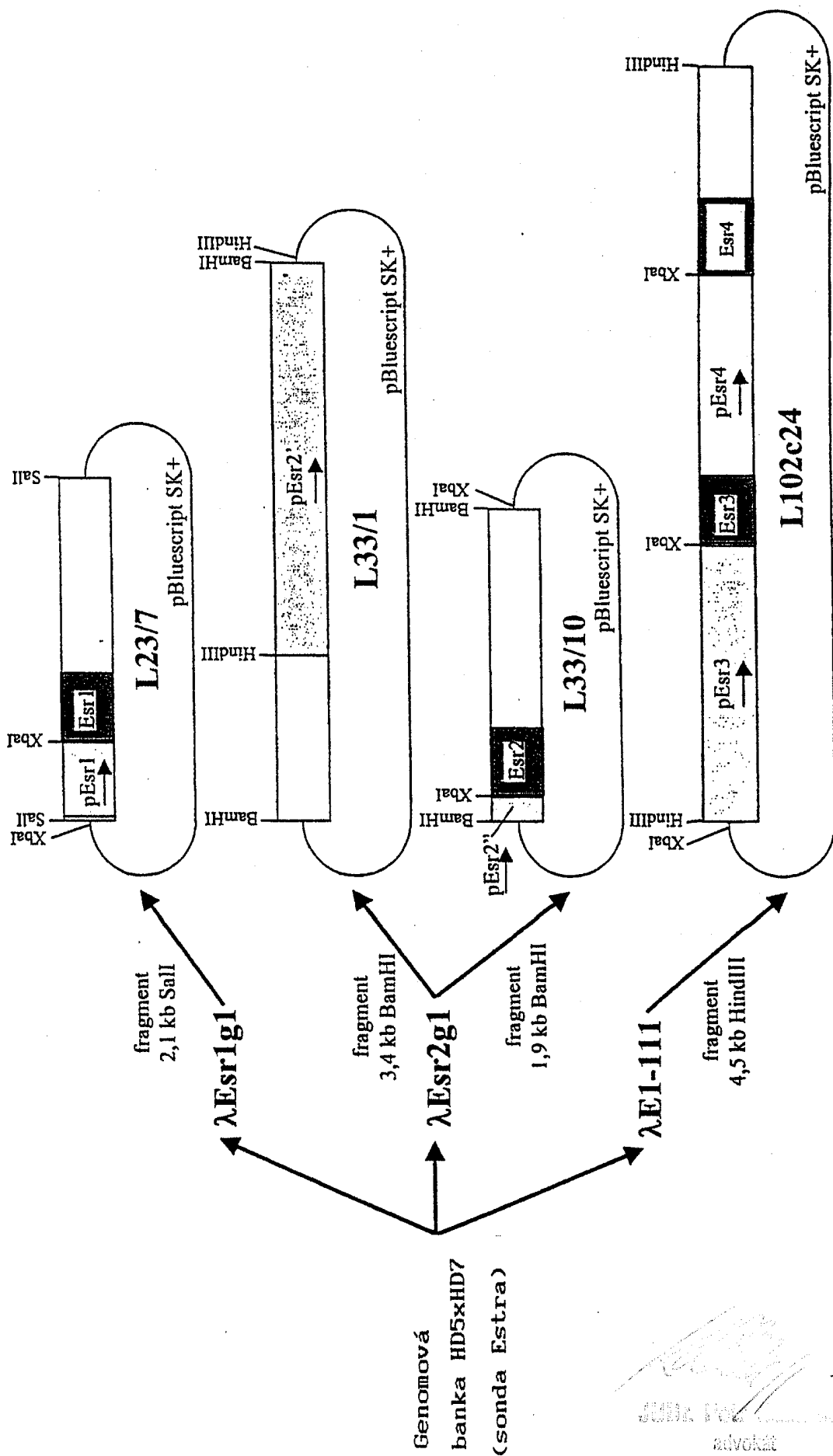
SPOLUPRÁVNÍ ADVOKÁTNÍ KANCELÁŘ
VŠETECKA ZELEŇÝ ŠVABICH KALENSKÝ
A PARTNERI
120 00 Praha 2, Mládkova 2
Česká republika

29.03.02

1/11

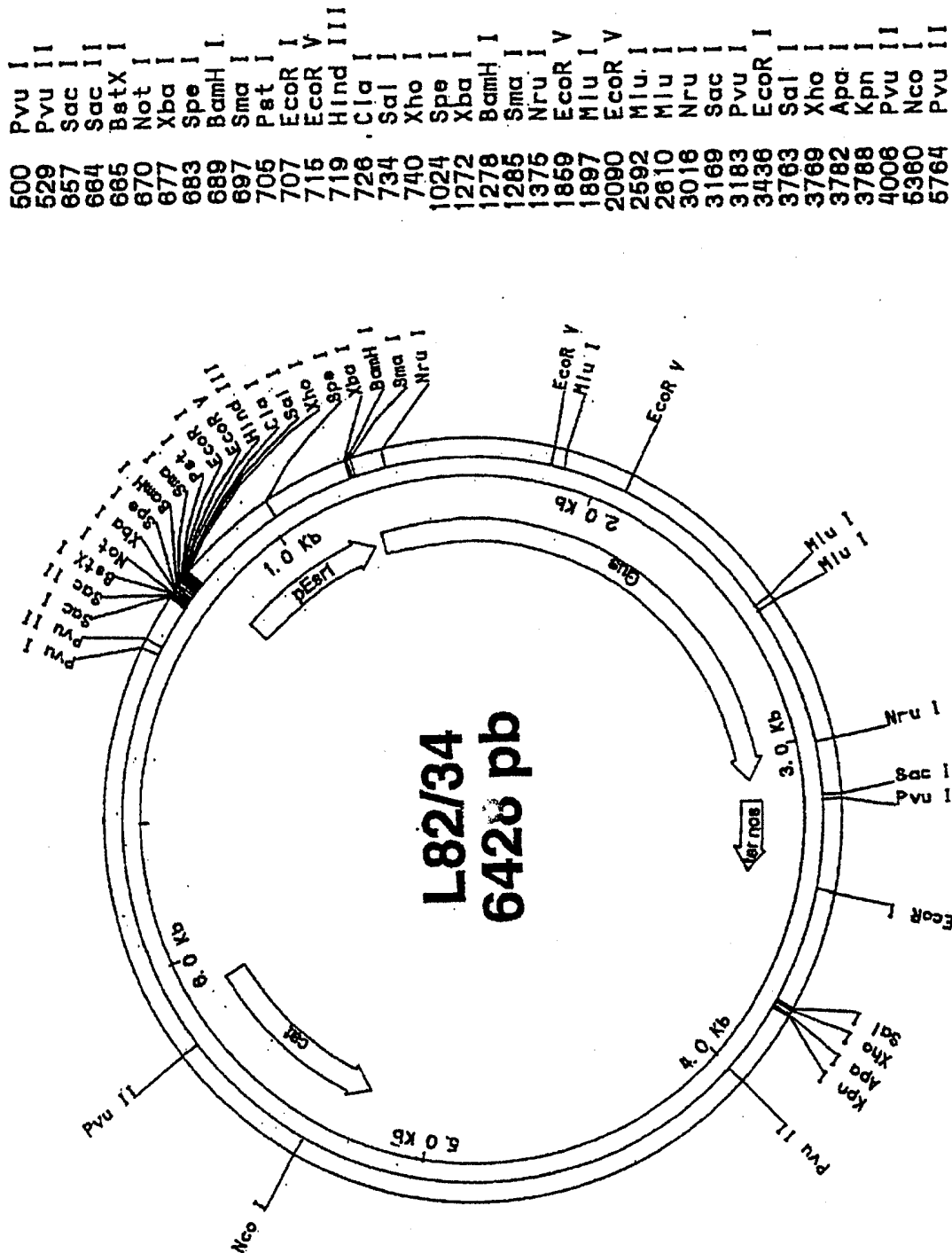
PV 2002-1139

24649



OBR. 1

2/11



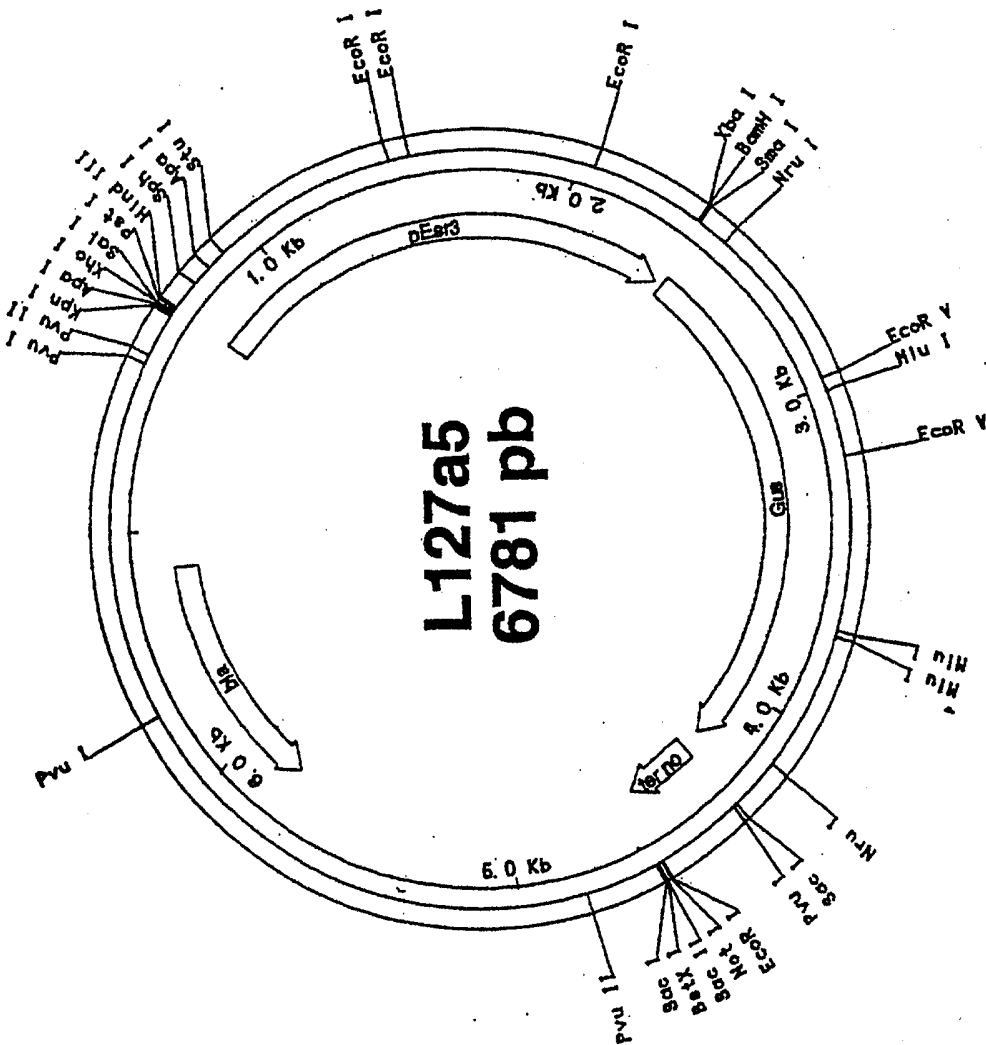
OBR. 2

JUNE 1964

29.03.02

4/11

503	Pvu I
532	Pvu II
557	Kpn I
583	Apa I
668	Xho I
674	Sal I
683	Pst I
688	Hind III
777	Sph I
837	Apa I
902	Stu I
1450	EcoR I
1509	EcoR I
2053	EcoR I
2390	Xba I
2398	BamH I
2403	Sma I
2493	Nru I
2977	EcoR V
3015	Mlu I
3208	EcoR V
3710	Mlu I
3728	Mlu I
4134	Nru I
4287	Sac I
4301	Pvu I
4554	EcoR I
4581	Not I
4573	Sac II
4574	BstX I
4582	Sac I
4800	Pvu II
6239	Pvu I



OBR.4

[Handwritten signature]
JUDITH K. K. K. K.
advocate

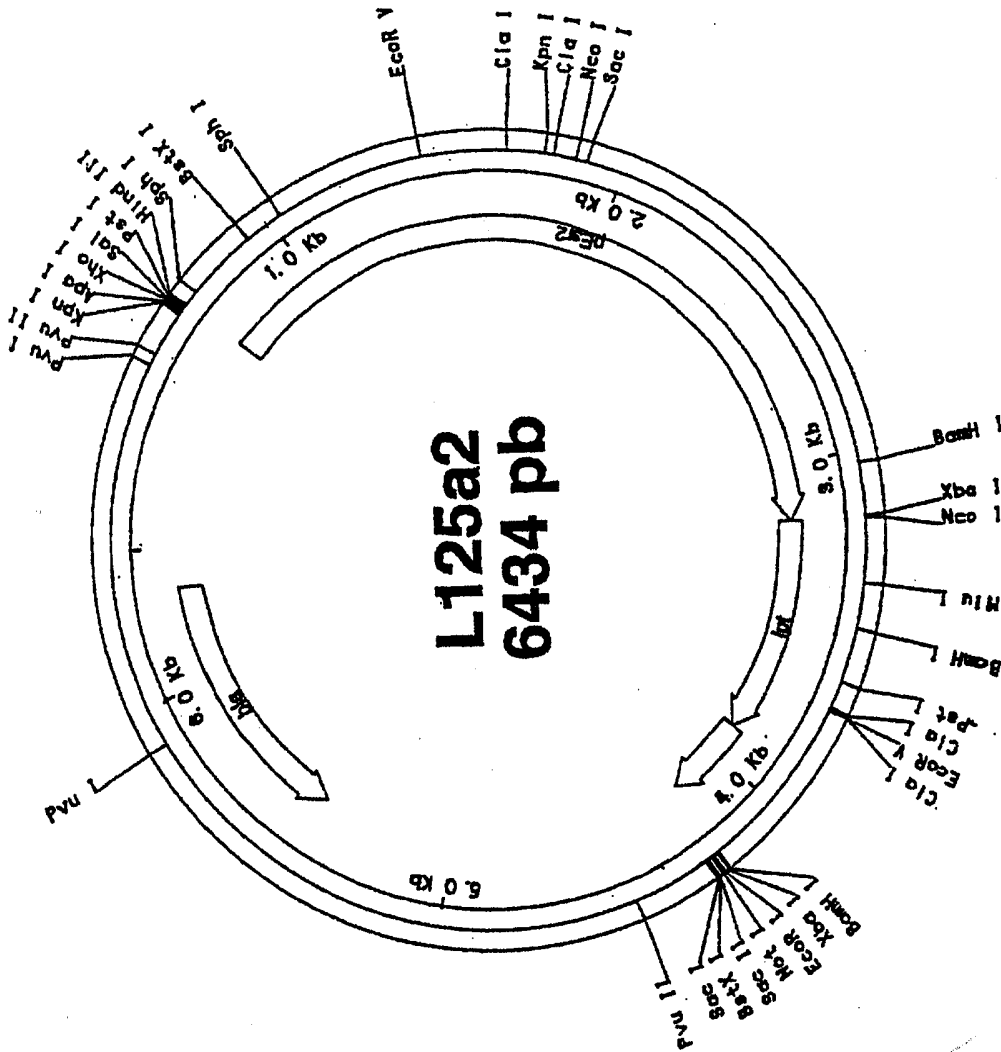
5/11



advertiser

6/11

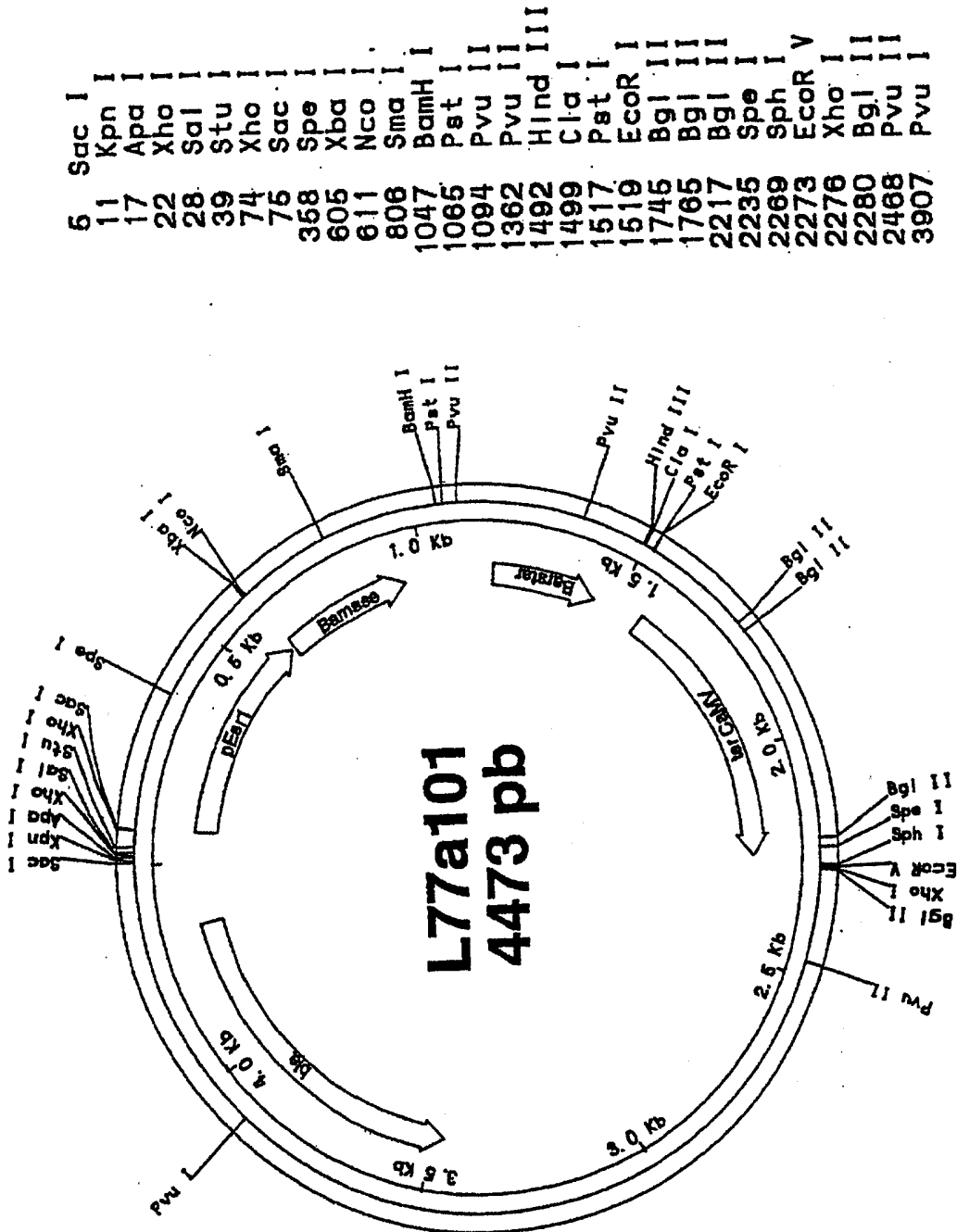
503	Pvu I
532	Pvu II
657	Kpn I
663	Apa I
668	Xho I
674	Sal I
683	Pst I
688	Hind III
730	Sph I
925	BatX I
1033	Sph I
1443	EcoR V
1675	Cla I
1779	Kpn I
1806	Cla I
1870	Nco I
1901	Sac I
3037	BamH I
3175	Xba I
3183	Nco I
3353	Mlu I
3476	BamH I
3625	Pst I
3696	Cla I
3704	EcoR V
3706	Cla I
4192	BamH I
4198	Xba I
4207	EcoR I
4214	Not I
4226	Sac II
4227	BatX I
4236	Sac I
4453	Pvu II
5892	Pvu I



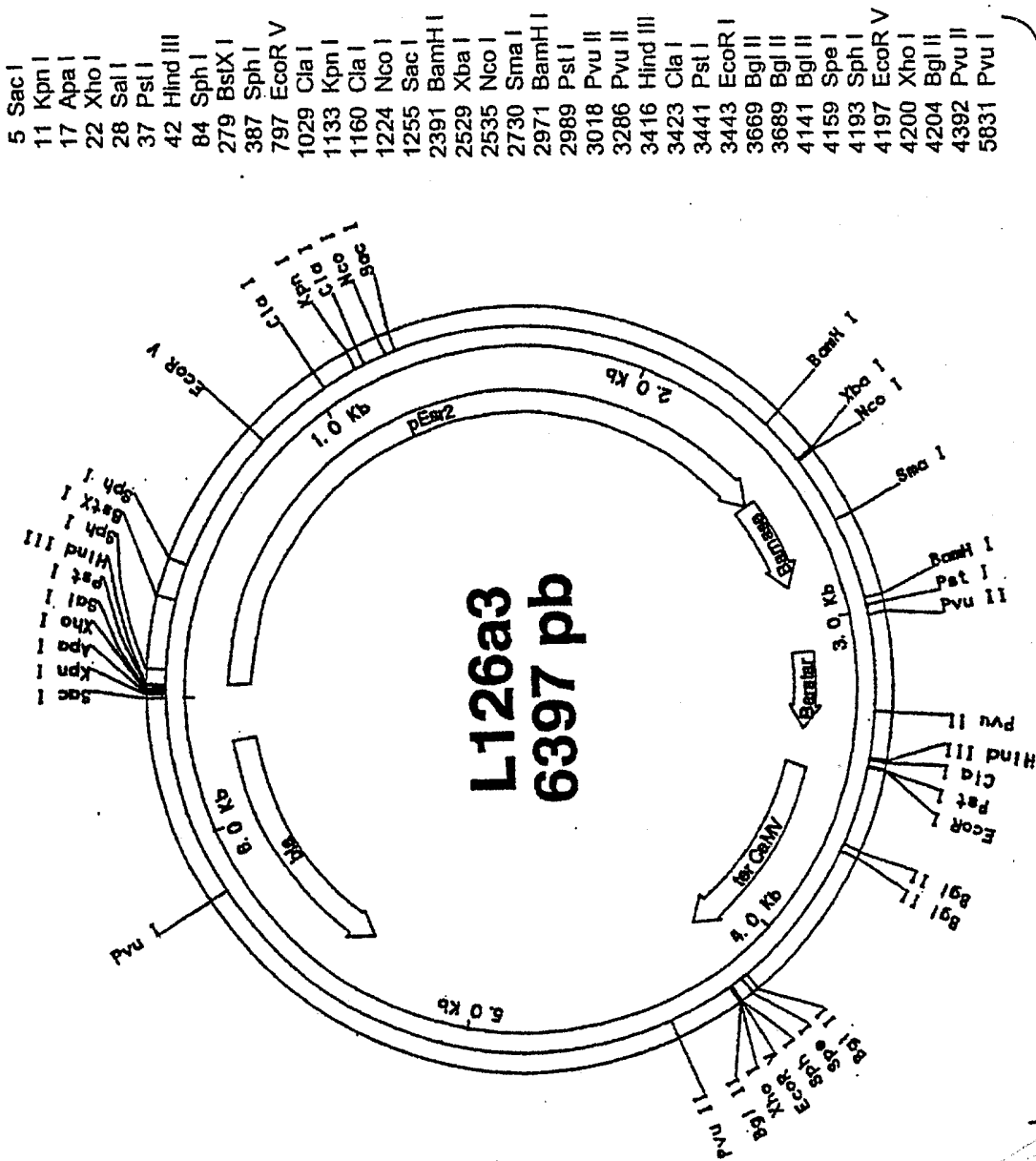
OBR. 6

John Henry Williams
1894

7111



OBR-7

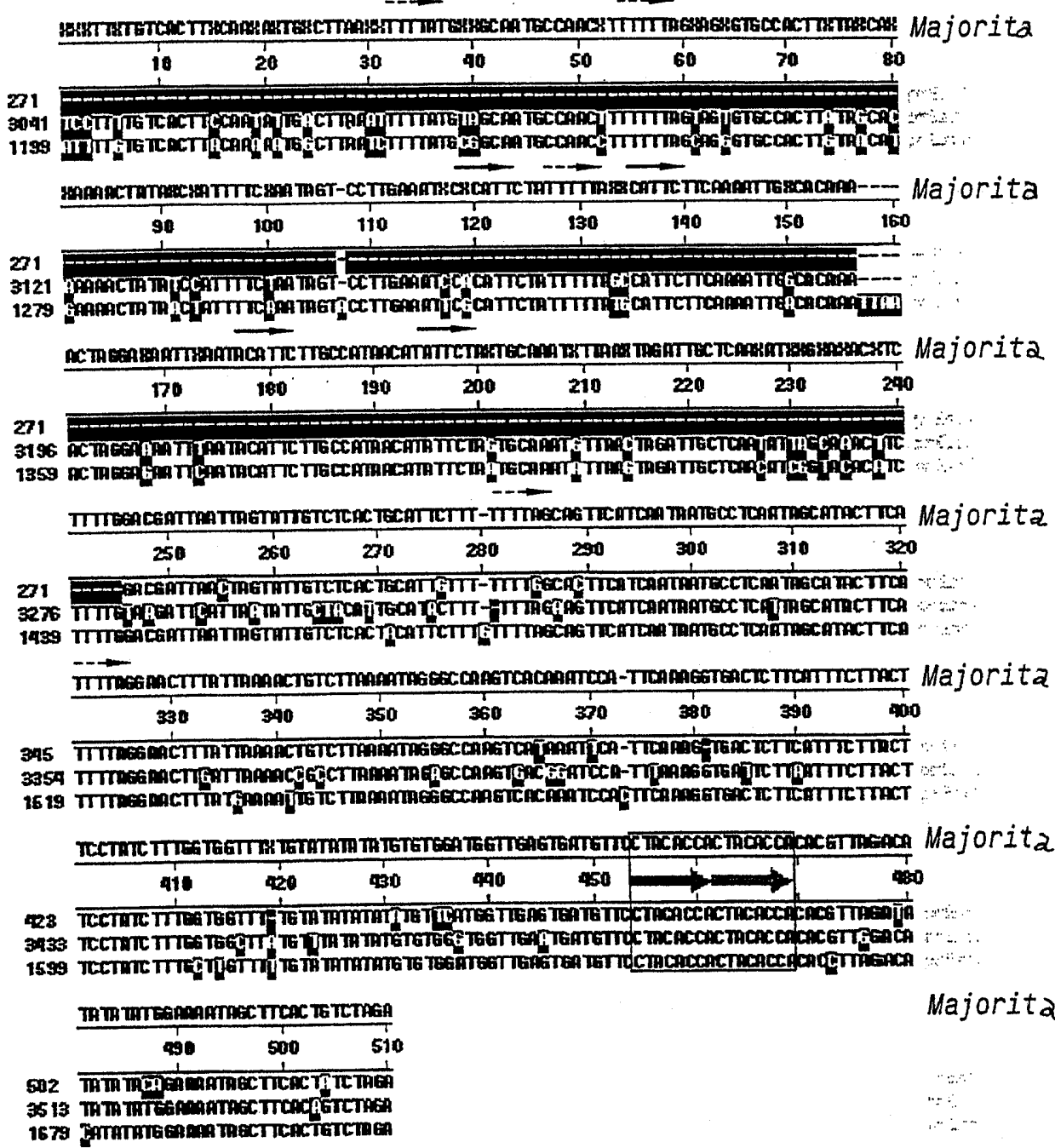


OBR - 8

2000

29.03.02

9/11



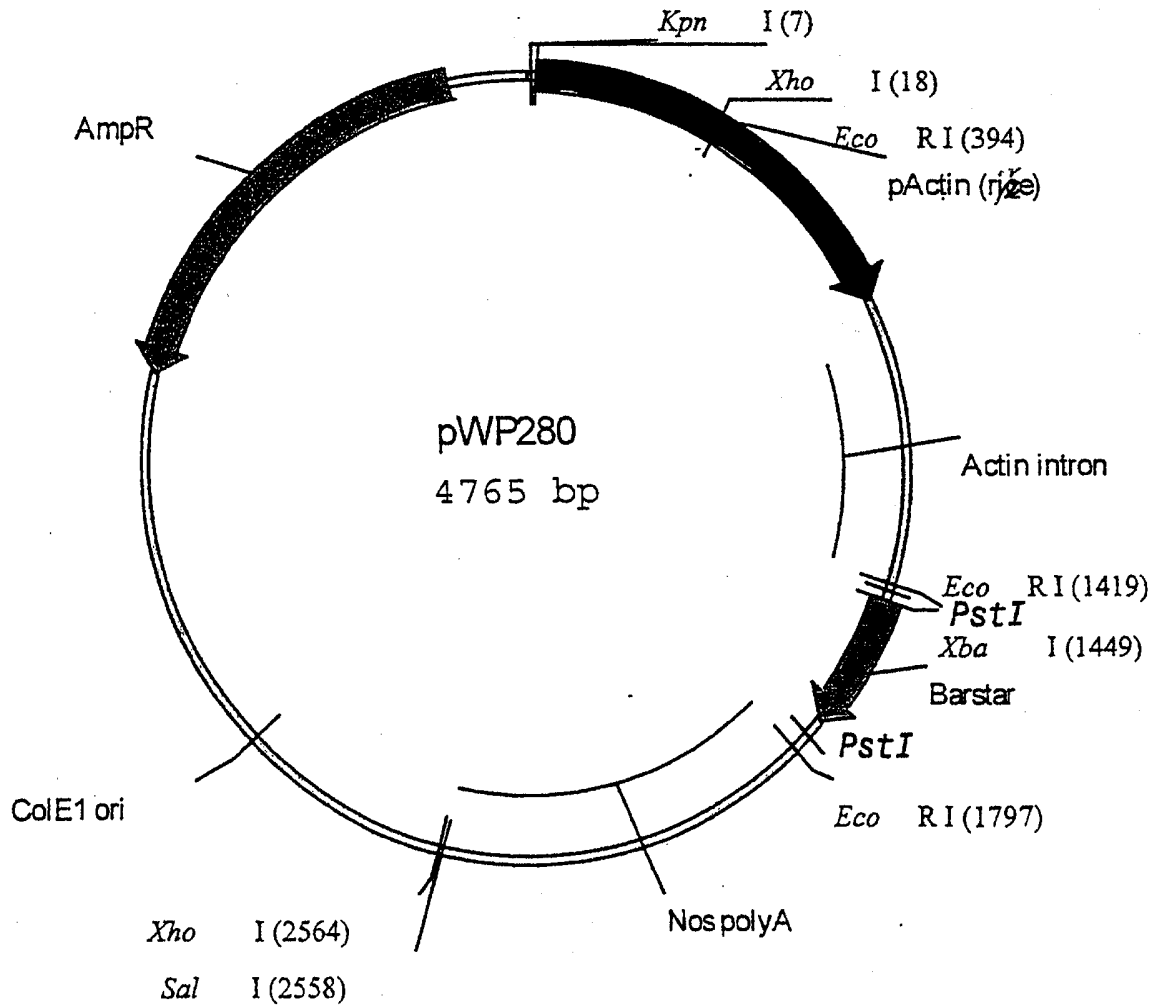
OBR.9

→ opakování CTACACC za sebou
 → opakování TTTTA → opakování ATTCT

[Handwritten signature]
 advošt

10/11

29.03.02



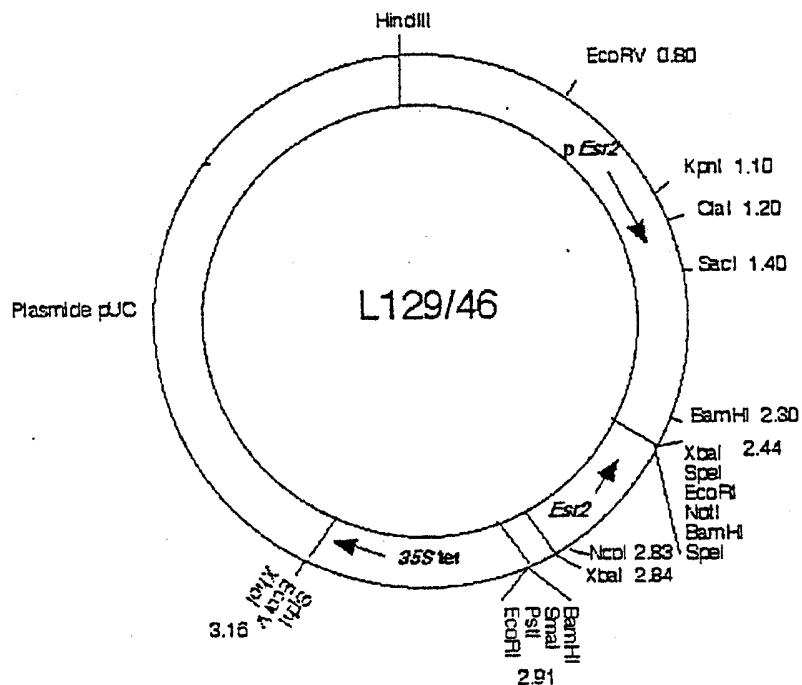
OBR-10

[Handwritten signature]

JUDE Peter Valer
adviser

29.03.02

11/11



pEsr2 promotor genu Esr2

Esr2 sekvence kódující gen Esr2

25 ter. Terminátor CaMV 35S

OBR. 11

[Signature]
JUDr. Petr Kalančík
advokát

29.03.00

Seznam sekvenci

PV 2002-1139

24649

<110> Biogemma

<120> Specifické promotory albumenu rostlinných zrn

<130> BFF 99/496ext

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 531

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 1

gatcattaag gactaagcag tcttttttccc tttcggttg catcatcttt agtcttcac 60
actattataa gccgaagcta ttaccccttg gctatagctt cgggtgttcat ctttattatc 120
ttcggactat gtcttcacct tgtatacctt tgtcttgggg gaaaaccttc atcctgaagc 180
cgaagctccc tgtaataatt catatcatgc taaaaataaa tgggtcagtc tggttttgag 240
gaccttcgga agaggaaggc cccccaacaa gacgattaac tagtattgtc tcaactgcatt 300
gtttttttgg cacttcatca ataatgcctc aatagcatac ttcatcttag gaactttatt 360
aaaactgtct taaaataggg ccaagtcata aattcattca aagtgactct tcattttctta 420
cttcctatct ttggtggttt tgtatatata tatgttcag gttgagtgt gttcctacac 480
cactacacca caggttagat atatatacag aaaatagctt cactatctag a 531

<210> 2

<211> 2493

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 2

aagctttttcc ggtgatgaag cacctgtaat acttaacagc atgctgaaaa caaatagtta 60
gctgtgtttt tgaggacctt cggaagatga agggcccca caccatccat gcatcaagtc 120
cccagactt gcaaaaaagc aaattttatc aaaattttctc ataaaacact tgaaaacatt 180
tctctttttt aaaagtgtag agcactagca actgtctact aaaaagggtc ccaaatttct 240
gggtataaca atcgcatggt aaataacaca aaggaaatcc tactaagagc agtaatttgg 300
ctaaaaaat agtgagcatt ttaatgtaat agggaaatagg agcatgcaat acttgtgttc 360
tttcagggtt ttgatgtcct caaaagtgtg ccccccctggg gcagttgcaa cactcaaaaat 420
ctactcgtat acataaaagaa acatgggcac aaaataagaa acaatactca aattatgaaa 480
aagggttcaaa tggctctata attattgtag acatttttaga atttatttta gaccaaaacc 540
atttaaatat gggttaaaat gagtttagata ttaatattta ttcagtttat agttatttgg 600
gacatttatt tacttaacta taacttctag ggttttaaaa gttaaattttg ggtccctagt 660
tggaactagc tcagattgct ggttgatttc cataaaagtc gaggttcctt tagcaaaaat 720
ccacggtgaa caagggggag atagggtgtg accgatatct cttaaattttg atcgttggag 780
ggcacatgga tgtctcagat taaatgggtg atgtgcaagc gacgcgcaca cgatggagga 840
atggcttcac gacgggtggc tactagagct ggctacgtca accaatggag ggctcgggtca 900
aggtcaaaaat ttgttgccaa gccactgttg ctcacgatga gtcgattgag cacatatcaa 960
ggctcaggggt caaccagagg ggcaagatcg atggtgcagt ggtgttctcg atggaagggg 1020
aaacttcggt gagcaattca agatttccta tcatgtgacc gggtcagggg atgggcgcac 1080
gggggttgggt accttctggt gcacatcatg ttgctgtatc gatgtcaagg gagcattagg 1140
gttcacagag cagcgatgac gggcatgggt ggacttgtgt caccatgggt cgatcaacta 1200

29.03.00

```

gggacgatag agctctatga agtttcacaa cttcctcaca ctctagggat catgggtgaca 1260
aaggtgggga ggacggggcg tctctagtga ggggtggaatg cagttctgtc acgtgggaat 1320
agtggcgcca tcgcttgtaa tgaataaaaag gtgcttgggt ggctgggaag tgcaatatga 1380
gggaagtagt tgggtgcgggg atgttccttt tataaaggag caccattgat taatggaaga 1440
caatgacaca aaggggtggtg cgacagttta aagctcgaat gctgctagggt gtgctcaagg 1500
ttaaaagatc aggcacaggg gaggaaggc agggataaaa tttctttact ccagttgtgg 1560
ggtgatgggg acagggttag tgctcaagca agggagggcg agttcagcgc agagatgcct 1620
gttgtgacac atgggggggg gggaattgga ggttggggtt gaccaggtga cgttatggcg 1680
tgacccagag aagagaccca ctgatgggga aaaaagggtgc caacaggtgg ggaccaaggt 1740
gtcagtgact caccgtgaca tgttattgga aagttacgtc cggaatgggtt tgggcctgag 1800
tgatctaggc tggctcgggc actgtgctga tcctttaatt tctccattcc caatttaagt 1860
tgaattttta attcaaatac aatgactcca aatctctcca aaattacca aatatagaat 1920
atntagatga atatgttggt ggagtttggg ctccgctttt ggtagtatg tttgtataaa 1980
aataatttct ctcttttgt cacttccaat attgacttaa atttttatgt agcaatgcc 2040
acttttttta gtagtgtgcc acttatagca caaaaactat atccattttc taatagtcct 2100
tgaaatccac attctatatt tagccattct tcaaaattgg cacaaaacta ggaaaattta 2160
atacattctt gccataacat attctagtgc aaatgttaac tagattgctc aatattagca 2220
aacttctttt gtaagattca ttaatatgct tacattgcat acttttttag aagttcatca 2280
ataatgcctc attagcatac ttcattttag gaatttgatt aaaaccgcct taaaatagag 2340
ccaagtgcg gatccattta aaggtgattt ttaatttctt acttcctatc tttggtgggt 2400
tatgtttata tatgtgtggg tgggtgaatg atgttcctac accactacac cacacgttgg 2460
acatatatat ggaaaatagc ttcacagtct aga 2493

```

<210> 3

<211> 1708

<212> ADN

<213> Zea mays

<400> 3

```

aagcttagaa attttaaaaa aagccaggca agcgttggtg tgcaaagagc taaaaattag 60
gaagacaaga gaacacggca agaaagcatg ctaaatgtgc tcgcggtgcg ttcttattta 120
tacgctcaat acgttgcaag tggtagggcc ccacttgtca ttgactattg ctattctagc 180
aaaggggaagg tgtttttcgg accttcggct taaggccttc gtccatctcg caatctgaat 240
ttatcattct aacaaattaa tattgtgagg ggctactggt gggggccttc gacttcggaa 300
ggtcctcaaa aactggttta acagtgtttc tggagtataa tgcataaaca ggtatcttcg 360
ggtttggatc agaactacaa catgaagagg cacaaagaac acgaagggtg gcgcagagcc 420
gaagctcacg tgtaggagag cttcggcacg acagcagaaa aagggaaccg acttaaaagg 480
aaaggctatt cagacctoga tggatttcta taggtcatta gcaaatgtaa agggcatgaa 540
tgtaatttta catgggctgt gtcttgcct ataaatagat gaacagtact ctgctactgt 600
tcacgctgac ttggcattcg ctttttgcac cacgcttgta cccttgcttt ccttcaaacc 660
gaaggtacat ctataatttg ttattgtgtt attgtggata tggtaatgca aataaaaaata 720
agttgatgat aatgtttata ttatttttcg tatttcatat atgaattctt cctcatcatt 780
tattgtgctt acgaagggtt ttcttcaaaa atctttgtcc ggaattcatt atatccgaag 840
ggaaataatg tctcgaagga cgaaggactt tgatatattaa cacttttcat gttgccttgt 900
tcttgactct tagcatttga gaacaagtcc ccaacagctc ctaagctctt ctttgaagaa 960
acaactacta gatgaagttt ctccaaaagt acgtccattg aatggagtaa agagtcattt 1020
gacctctcgg aataaaaatta aaatgagaat aagtaagaat aaaacacctc tattatcaaa 1080
tctaggccat acaaaccattt ggtattacta aaaaatagct aatgccatct ttcaacattt 1140
ggaagttaaa accaaccaat ctcactcat tcccaagaaa tattggatca tatttaacat 1200
tttgtgtcac ttacaaaaat ggcttaatct tttatgcggc aatgccaaac ttttttagca 1260
gggtgccact tgtaacatga aaactataac tattttcaaa tagtaccttg aaattcgcat 1320
tctattttta tgcattcttc aaaattgaca caaattaaac taggagaatt caatacattc 1380
ttgccataac atattctaata gcaaatatta agtagattgc tcaacatcgg tacacatctt 1440
ttggacgatt aattagtatt gtctcactac attctttggt ttagcagttc atcaataatg 1500
cctcaatagc atacttcatt ttaggaactt tatgaaaatt gtcttaaaat agggccaagt 1560
cacaaatcca cttcaaagggt gactcttcat ttcttacttc ctatctttgc ttgtttttgt 1620
atatatatgt gtggatgggt gagtgatgtt cctacaccac tacaccacac cttagacaca 1680
tatatggaaa atagcttcac tgtctaga 1708

```

29.03.00

<210> 4
 <211> 1232
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 4
 tagttcatgc aaaagtagtg agtggtttata cacctatgcc aatgaataac ctctaactac 60
 cctcatgtac tggcctgggtg tttggtaaac atgaagcaat aatttcctct tatcaaaata 120
 cgggtctcaa gctgcatgtg aaaaataata aatatttttt tgaagtgaat gaaaaatgat 180
 aaatatgaaa cagtaaatct ttcggttgaa aaagtacatc tctattatta acgataacct 240
 atatatcaat ctacaatgog ctcatctgca tctcgatgca tactttcatc attttatgaa 300
 tgtacttttaa tgataagaag gattagaatg ttcttggttt cctcttattc ttaccttttt 360
 caaaattatc agttttccat gtctgaatat gcaatgcatt ataaacctta gtcagcatat 420
 atcaagtcga tatataatgc tatatgttta agaactgggtg ctgagtatgt ctactcaaca 480
 tatttttttag ctattggatc gagcagttta gtaaaggtaa actacattta tctatcttca 540
 agttgtattt tcccacctt aaattatgaa agggagtaac gctccactcc aactggtgaa 600
 agggaacaaa tttggtctcc ggactgattt cattgggtgt tctctatttt ttaaaacaac 660
 aaaaaaacat atttgttctc tgaaaaattga taattaatta atcataaatt agggaaaaaa 720
 ctatatgaaa ctagtatatg ttttcttcta aaattattgt ctgtctgttg gtgctctagt 780
 tatagagtta taacatgaaa actatagcca ttttcaaata gtgccttgaa attcattttt 840
 gtttagccat tcttcaaaat tgccaccaa ccaggagaat ttattaataa attcacgcca 900
 taacatattc tagtccaaat gttaagtgga ttgctcaata tcattatact tcttttggac 960
 gattcattag tactgccttg ttgcatactt tgttttagca gttcatcaat aatgcttcac 1020
 tagcataatt catgttagga acttgattaa aactgcctta agaacatggc aaagtgataa 1080
 atccacttca aaggcaatta ttaatttctt acttcctatc tttggtggtt tttgtatata 1140
 tgtgtgtggg tggttgagtg atgcacacat tttcctacac cactacatca caccttggac 1200
 atatatgtga aaaaatagct tcgcagtcta ga 1232

<210> 5
 <211> 499
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 5
 ttttgtcact tccaatattg acttaaatTT ttatgtagca atgccaaact ttttttagtag 60
 tgtgccactt atagcacaaa aactatatcc attttctaata agtccttgaa atccacattc 120
 tatttttagc cattcttcaa aattggcaca aaactaggaa aatttaatac attcttgcca 180
 taacatattc tagtgcaaat gttaactaga ttgctcaata ttagcaaaact tcttttgtaa 240
 gattcattaa tattgctaca ttgcatactt ttttagaagt tcatcaataa tgcctcatta 300
 gcatacttca ttttaggaac ttgattaaaa cgccttaaaa atagagccaa gtgacggatc 360
 catttaaagg tgattcttaa tttcttactt cctatctttg gtggcttatg tttatatatg 420
 tgtgggtggt tgaatgatgt tctacacca ctacaccaca cgttggacat atatatggaa 480
 aatagcttca cagtctaga 499

<210> 6
 <211> 507
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 6
 ttgtgtcact taaaaaatg gcttaatctt ttatgcggca atgccaaact ttttttagcag 60
 ggtgccactt gtaacatgaa aactataact attttcaaat agtaccttga aattcgcatt 120
 ctatttttat gcattcttca aaattgacac aaattaaact aggagaattc aatacattct 180
 tgccataaca tattctaata caaatattaa gtagattgct caacatoggt acacatcttt 240
 tggacgatta attagtattg tctcactaca ttctttgttt tagcagttca tcaataatgc 300

29.03.02

ctcaatagca tacttcattt taggaacttt atgaaaattg tcttaaaata gggccaagtc 360
 acaaatccac ttcaaagggtg actcttcatt tcttacttcc tatctttgct tggttttgta 420
 tatatatgtg tggatgggtg agtgatgttc ctacaccact acaccacacc ttagacacat 480
 atatggaaaa tagcttcact gtctaga 507

<210> 7
 <211> 265
 <212> ADN
 <213> Zea mays

<400> 7
 namgattmay tartattgyy wcaytcatw sntnttttr gmasttcac aataatgcct 60
 cawtagcata cttcatttta ggaacttkat kaaaayygyt ttaaaatagr gccaagtsay 120
 rratycantt yaaagntgay tcttmatttc ttacttccta tctttgstkg yttwngtwta 180
 tataatrtgk srtgggtgar tgatgttcc acaccactac accacacstt rgayayatata 240
 ayrghaaata gcttcacwrt ctaga 265

<210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 8
 ggggtctaga ctgtgaagct attttcca 28

<210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 9
 ggggaagctt tacattcttg ccataacata 30

<210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 10
 ggggaagctt ttcacata atgcctcatt 30

<210> 11

29.03.02

<211> 30
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 11
ggggaagctt taatttctta cttcctatct

30

<210> 12
<211> 27
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 12
ggccagtoga caaagcggcc gcatgca

27

<210> 13
<211> 19
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 13
tcagctgttt cgccggcgt

19

<210> 14
<211> 14
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 14
tcgactgcag ccca

14

<210> 15
<211> 14
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 15
gacgtcgggt tcga

14

<210> 16
<211> 16
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 16
ctagaccgga attcgc

16

<210> 17
<211> 16
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 17
tgggcttaag cgccgg

16

<210> 18
<211> 15
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 18
gatccactag tcccg

15

<210> 19
<211> 15
<212> ADN
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 19
aattcgggac tagtg

15

<210> 20
<211> 17

29.03.02

<212> ADN

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 20

aagcttttttg cggccgc

17

<210> 21

<211> 25

<212> ADN

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: oligonukleotid

<400> 21

tcgagcggcc gcaaaaagct tagct

25

JUDr. Petr Kolář
advokátSTANISLAV ZEMANOVSKÝ KANDIDÁT
ČESKÁ REPUBLIKA
A PARTNERŮ
120 00 Praha 2, Hájkova 2
Česká republika