



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20020506A A2

HR P20020506A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **A 01 H 5/10**
C 12 N 15/82

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 10.06.2002.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 31.08.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/FI00/01081

Datum podnošenja međunarodne prijave 08.12.2000.

(87) Broj međunarodne objave: WO 01/41559

Datum međunarodne objave 14.06.2001.

(31) Broj prve prijave: 19992659

(32) Datum podnošenja prve prijave: 10.12.1999.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: FI

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelji:

Unicrop LTD, Helsinki Science Park, Viikinkaari 6, 00710 Helsinki, FI
Kimmo Koivu, Sammatintie 6 L 124, 00550 Helsinki, FI
Viktor Kuvshinov, Aarteenetsijäntie 4 F 54, 00970 Helsinki, FI
Anne Kanerva, Sammatintie 6 L 124, 00550 Helsinki, FI
Eija Pehu, Mechelininkatu 25 A 7, 00100 Helsinki, FI
Dina KORPER ŽEMVA, Zagreb, HR
Zdenko HARAMIJA, Zagreb, HR

(74) Punomoćnici:

(54) Naziv izuma: **POSTUPAK PRETVORBE ČUVANIH ZALIHA SJEMENJA DVOSUPNICA U PRIPRAVKE KOJI OBUHVAĆAJU JEDAN ILI VIŠE GENSKIH PRODUKATA**

(57) Sažetak: Sadašnji izum se odnosi na postupak temeljen na sakupi-pretvori (engl. source-sink) načelu, za proizvodnju zanimljivih proizvoda od izlomljenih (zgnječenih) ili nezgnječenih proklijalih sjemenki dvosupnica koji obuhvaća sustav ekspresije, koji je induciran ili može biti induciran tijekom klijanja. Produkt je pripravak sjemena koji obuhvaća jedan ili više genskih produkata. Na drugi način je to zanimljiv produkt, dobiven smještanjem pripravka u dodir sa supstratom, koji sadržava tvar koja se može transformirati s pripremkom dobivenim iz sjemena kao takvim, sušenim ili u obliku postupka nizvodno.

HR P20020506A A2

OPIS IZUMA**Tehničko polje izuma**

- 5 Sadašnji izum se odnosi na postupak temeljen na sakupi-pretvori (engl. source-sink principle) načelu za pretvaranje čuvanih zaliha transgenog sjemenja dvosupnica u pripravke koji obuhvaćaju jedan ili više zanimljivih genskih produkata. Izum također otkriva pripravak dobiven iz prokljalog sjemena koji obuhvaća najmanje jedan genski produkt u supki uključujući presadnicu ili u podlozi koja okružuje prokljalo sjeme ili presadnicu.

10 **Pozadina izuma**

- Načini proizvodnje terapijski djelotvornih bjelančevina sisavaca izoliranjem i pročišćavanjem od sisavaca kao izvora su danas u većini zamijenjeni tehnologijom rekombinantne DNK, radi povećane opasnosti od zagađenja, osiguravajući nove načine za proizvodnju velikih količina industrijski poželjnih bjelančevina sisavaca. Tehnologija rekombinantne DNK osigurava veliki izbor domaćina i sustava ekspresije. Kada su bjelančevine sisavaca željeni cilj bjelančevine, poželjan je eukariotski sustav domaćina s ciljem dobivanja glikoziliranih oblika željenih bjelančevina.

- 15 Gljivice predstavljaju najdjelotvorniji sustav domaćina za visoke zapremnine i niske troškove proizvodnje glikoziliranih proteina. Čak i ako su gljivice bile uspješne za proizvodnju visokih količina njihovih prirodnih proteina, nisu bile jednako uspješne u ekspresiji heterolognih proteina, kao što su terapijski proteini sisavaca.

- Gljivice se danas uglavnom koriste za proizvodnju na velikoj skali homolognih industrijskih enzima, dok se žarište istraživanja okrenulo na pronalaženje drugih sustava ekspresije za produkciju glikoziliranih heterolognih proteina. Radi toga što procesi glikozilacije i savijanja kod biljnih sustava domaćina naliče onima kod sustava sisavaca, sustav 25 ekspresije biljnog domaćina je do sada po troškovima najisplativiji od dostupnih sustava. Glavno zanimanje je usmjereno na proizvodnju farmaceutika i industrijski važnih enzima. Može se spomenuti proizvodnja interferona, enkefalina, epidermalnog faktora rasta i ljudskog albuminskog seruma u duhanu i/ili krumpiru. Razine ekspresije kod transgeničnih biljaka su dosta niske.

- 30 Kod biljaka se strani geni općenito ekspresiraju uz jake specifične biljne promotore u biljnim organima u razvoju. Tipični primjeri su promotor proteina za pohranjivanje sjemena ili specifični promotor patatina u gomolju kod krumpirovih gomolja. Na drugi način, kulture stanica ili organa i kulture algi se koriste čak i na sofisticiraniji način koji uključuje sustave temeljene na virusu biljke, sa željenim genom povezanim unutar genoma virusa i ekspresiraju se konkurentno s viralnim proteinima. Najnapredniji sustavi počivaju na inducibilnoj ekspresiji i izlučivanju 35 rekombinantnog proteina u medij.

- Patenti US 5,693,506 i US 5,994,628 otkrivaju sustav produkcije za proizvodnju stranih proteina u prokljalom sjemenju monosupnica. Rekombinantni proteini su ekspresirani pod jakim promotorom amilaze u staničnoj kulturi ili prokljalom sjemenju i protein se izlučuje u hranjivu podlogu ili se ekstrahira iz slada. Kod sjemenja monosupnica pohranjene rezerve se uglavnom sastoje iz škrobastog endosperma. Zalihe proteina kod monosupnica su oskudne kada se 40 uspoređuju s onima kod sjemenja dvosupnica. Dodatno, čak i ukoliko je ekspresija amilaze visoka kod specifičnih stanica, samo mali broj stanica u sjemenju ima ekspresiju amilaze. Ove stanice su ograničene na skutelum embrija i aleuronski sloj endosperma. Postoji velika potreba za nalaženjem jeftinijih sustava koji bi trebali koristiti prednost pohranjenih zaliha proteina i ulja u sjemenju dvosupnica. Patenti US 5,543,576 i US 5,714,474 otkrivaju način u kojem 45 se transgenično sjemenje dodaje bez predkljanja i u smravljenom obliku u hranjive smjese kao dodatni izvor enzima.

- Patent US 5,670,349 otkriva uporabu za rane inducibilnih HMGR/HMG2 promotora za ekspresiju rekombinantnih proteina u svježim listovima duhana ubranih na polju. Povređivanje svježe ili uskladištene biljne tvari sječenjem ili gnječenjem povlači brzo povećanje ekspresije. Međutim, sadržaj proteina u listu duhana je mali upoređujući s onim 50 dobivenim iz sjemena dvosupnice. Nadalje, skladištenje svježih listova nije uporedivo s onim suhog sjemena s obzirom na vrijeme, prostor i/ili troškove skladištenja. Uporaba svježe biljne tvari, kao što je lišće pobrano s polja je također glavni izvor mikrobiološkog zagađenja, koje je ozbiljan problem u tehnologiji fermentacije.

- Patentne prijave WO 94/11519 i WO 97/32986 otkrivaju načine i biljke za proizvodnju produkata odgradnje i pretvorbe 55 kod biljaka uz pomoć postupka slađenja. U rečenim načinima je predloženo da su enzimi djelotvorni u glioksisomima, koji kataliziraju raspadanje masnih kiselina u acetyl-CoA. Ovaj acetyl-CoA koji se uobičajeno koristi za pravljenje organskih kiselina koje će se izvesti iz glioksisoma i koristiti u drugim metaboličkim putevima, kao što su disanje i sinteza saharoze bi se trebali zamijeniti s enzimima koji dekodiraju gene u putevima koji vode do polihidroksialkanoata korisnih za produkciju biorazgradljivih termoplastika.

- 60 Čak ukoliko je i postupak slađenja poznat i da se koristio posebno za pripravu monosupnica, treba zabilježiti da su ti postupci ograničeni na procesiranje škroba. Načini otkriveni u patentima WO 94/11519 i WO 97/32986 čak i ukoliko

oni predlažu uporabu uskladištenih pričuva u dvosupnicama, oni su ograničeni na uporabu enzima i puteva koji vode u saharozi i proizvodnji energije i način uporabe tih produkata od putova disanja za sintezu.

Čak ukoliko je postupak slađenja poznat i načini za uporabu respiratornih putova kod biljaka za produkciju polihidroksialkanoata, uporaba uskladištenih pričuva kod dvosupnica za produkciju proteinastih produkata, kao što su strukturalni proteini i enzimi nisu riješeni.

Treba se zabilježiti da postoji velika potreba za proteinaste produkte i zbog toga je glavni cilj sadašnjeg izuma riješiti problem pretvaranja uskladištenih pričuva kod biljaka u različite proteinaste produkte, koji se kasnije mogu primijeniti za proizvodnju željenih produkata.

Glavni cilj sadašnjeg izuma je osigurati novi, prilagodljiviji, manje skuplji, za okoliš prikladan postupak i sustav produkcije za proizvodnju genskih produkata, osobito proteinastih genskih produkata u kotiledonima transgeničnih sjemenaka dvosupnica. Još jedna prednost sadašnjeg izuma je što on osigurava sustav produkcije za uporabu u posudi, u kojem se genski produkt može proizvoditi u graničnim uvjetima a ne u polju. To dozvoljava sadašnjem postupku da se provodi pod uvjetima skoro slobodnim od zagađenja.

Sažetak izuma

Ciljevi sadašnjeg izuma su postignuti iskorištavanjem regulacijskih sekvenci prolaznih proteina koji se nakupljaju tijekom inicijacije klijanja za produkciju željenih genskih proizvoda.

Osobine sadašnjeg izuma su kako su složene u zahtjevima.

Kratak opis crteža

Slika 1A prikazuje proklijano transgensko sjeme koje ekspresira GUS gen. GUS gen je povezan na promotor toplinskog udara soje. Na desnoj strani je pokazano netransformirana presadnica za nadzor.

Slika 1B prikazuje proklijano transgensko sjeme koje ekspresira GUS gen. GUS gen je povezan na promotor endopeptidaze.

Slika 1C prikazuje proklijano transgensko sjeme koje ekspresira GUS gen. GUS gen je povezan na promotor koji inducira salicilat.

Slika 1D prikazuje proklijano transgensko sjeme koje ekspresira GUS gen. GUS gen je povezan na 35S promotor.

Slika 2 prikazuje bezbojni supstrat β -glukuronida (100 μ g/mL) koji je enzimatski pretvoren u plavo obojenu glukopiranoziduronsku kiselinu i aglikon sa GUS enzimom kojeg je proizvelo proklijalo transgensko sjeme.

Slika 3 opisuje različite stupnjeve klijanja *Brassica campestris* sjemena, naznačene kao dani nakon početka klijanja.

Slika 4 pokazuje SDS-PAGE gel proklijalog sjemenja. Uzorci su skupljani dnevno, počevši od suhog sjemena. Uskladišteni proteini i Rubisco podjedinice su označeni u Coomassie obojenom gelu. Nakon tri dana klijanja, količina proizvedenog Rubisco proteina po danu je značajno porasla kako je vizualno pokazano na Slici.

Slika 5 prikazuje "northern blot" proklijalog sjemenja uporabom RNK proba. Uzorci su skupljani dnevno, počevši od suhog sjemena.

Detaljan opis izuma

Odrednice

U sadašnjem izumu najveći broj uporabljenih izraza ima isto značenje kako općenito imaju u području tehnika rekombinantne DNK, molekularne biologije i botanike, osobito u području povezanom s produkcijom transgenskih biljaka i genskih produkata. Neki izrazi su, međutim, uporabljeni na nešto drugačiji način i objašnjeni su detaljnije ispod.

Izraz "sjemensko bilje" znači *Spermatophyta* najrazvijenije biljke, naznačene s kompleksnim strukturama koje uključuju potpuno razvijene organe kao što je korijen, stabljika, list, cvijet i žilni sustav. Sjemensko bilje je podijeljeno u dva razreda, angiosperme i gimnosperme. Angiosperme su dalje podijeljene u podrazrede, to jest monosupnice i dvosupnice. Embrij zrelog sjemena monosupnice obuhvaća samo jednu supnicu koja je smanjena na apsorptivnu scutelu. Kod dvosupnica embrij ima dvije supnice koje služe kao organi skladištenja. Asimilati koji se zahtijevaju za skladišni polog kod dvosupnica su premješteni od matične biljke kroz žilni sustav na ovojnicu sjemena i konačno u supnicu. Ovojnica sjemena je matično tkivo i nema simplastičnog povezivanja na embrij. Asimilati prolaze u apoplazmički prostor i tada ih uzima embrij i preraspoređuje simplastično i koristi u sintezi pričuva.

Izraz "sjeme dvosupnice" znači sjeme dobiveno od biljke dvosupnice koje obuhvaća različite uskladištene pričuve uključujući bjelančevine, masti i ugljikohidrate nazočne u supnicama za razliku od uskladištenih pričuva sjemena monosupnica, koje se uglavnom sastoji od ugljikohidrata i samo manjih količina ostalih spojeva. U sadašnjem izumu

"sjeme dvosupnice" znači potpuno sjeme ili dio ili dio sjemena koje se može dobiti predlomljenjem sjemena, poželjno u suhom obliku. Treba se zabilježiti da se sadašnji izum odnosi na dvosupnice, monosupnice se ne mogu koristiti za postizanje ciljeva sadašnjeg izuma.

- 5 Najpoželjnije biljne vrste koje se mogu primijeniti za produkciju genskih proizvoda koji su zanimljivi prema postupku sadašnjeg izuma uključuju, ali nisu ograničene na biljke dvosupnice s visokim sadržajem proteina ili ulja u sjemenju. Tipični primjeri su slijedeće vrste: *Brassicaceae*, *Fabaceae* i *Polygonaceae*. Rod *Brassicaceae* uključuje na primjer slijedeće vrste: *Brassica napus*, *Brassica campestris*, *Camelina sativa*, *Sinapis alba*, *Fabaceae* uključujući *Lupinus angustifolius*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Vicia faba*, *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Vigna mungo* i *Medicago*
- 10 *sativa*. Rod *Polygonaceae* uključuju vrste *Polygonum*. Također suncokret, *Helianthus annuus*, je potencijalno koristan radi visokog sadržaja ulja u sjemenju.

Izraz "sakupi-pretvori" znači sustav produkcije ili suština produkcije, koji se može odijeliti u dva razdvojena stupnja, stupanj akumulacije u kojima su pričuve bjelančevina, ugljikohidrata i masti uskladištene u sjemenju i stupanj mobilizacije/produkcije u kojem se akumulirane rezerve umjesto da se normalno mobiliziraju radi započinjanja rasta mobiliziraju ili koriste za produkciju jednog ili više stranih genskih proizvoda koji su zanimljivi djelovanjem na sustav ekspresije. Stupanj akumulacije obuhvaća uzgoj transgenske biljke s bitno bez ekspresije genskog produkta u području dok je produkcija genskih produkata ograničena na klijanje u zatvorenim uvjetima. To je moguće zbog specifičnosti sustava ekspresije, opisanog detaljnije negdje drugdje u specifikaciji.

20 Izraz "okruženje" znači vodena puferirana otopina bilo u tekućem, polukrutom ili krutom obliku, koja obuhvaća tvari koje mogu inicirati, povećati, odložiti ili produžiti najpoželjniji stupanj klijanja. "Okruženje" može sadržavati čimbenike koji induciraju klijanje potiču regulaciju određenih postupaka i/ili čimbenike koji smanjuju regulaciju nekih drugih postupaka kao i vanjske hranjive tvari. "Okruženje" također može biti vlažan prostor ili soba.

25 Izraz "supstrat" znači kruti, polukruti ili tekući pripravak ili medij, koji obuhvaća najmanje jedan spoj ili tvar, koji se može prevesti u drugi spoj ili tvar s poželjnijim osobinama uporabom pripravka iz sadašnjeg izuma koji obuhvaća jedan ili više genskih proizvoda zanimljivih kao katalizatori.

30 Izraz "pripravak iz sjemena" znači sirovu smjesu proizvedenu postupkom iz sadašnjeg izuma koja se može dobiti iz proklijalog sjemena dvosupnica obuhvaćajući jedan ili više na novi način sintetiziranih genskih proizvoda ekspresiranih u supki proklijalog sjemena dvosupnice uključujući presadnice ili izlučenih u okruženje proklijalog sjemena ili presadnica. "Pripravak iz sjemena" se može koristiti kao takav, stavljanjem u dodir sa supstratom. Prirodno pripravak iz sjemena može biti sušen i/ili tretiran primjenljivim načinima nizvodnog postupka kao što može biti izoliran i/ili pročišćen prije uporabe. Na drugi način je supstrat reagens koji obuhvaća jedan ili više spojeva koji mogu promijeniti jedan ili više genskih proizvoda u pripravku. Na primjer supstituenti se mogu dodavati ili način savijanjem genskog proizvoda može biti promijenjen ili dijelovi uklonjeni ili dodani s ciljem dobivanja postojećeg proizvoda. "Pripravak iz sjemena" se također može pripremiti, to jest opskrbiti s pogodnim aditivima, kao što su sredstva za poboljšanje granulacije, punila, maziva itd. Proklijali pripravak iz sjemena sadašnjeg izuma se također može dodati u životinjsku hranu radi poboljšanja probavnih osobina hrane.

40 Izraz "bitno sterilan sustav sakupi-pretvori" znači da se sjeme dvosupnice može površinski sterilizirati načinima kao što su radijacija ili kemijska sterilizacija. Klijanje se može provesti u ili na predsteriliziranom okruženju, uporabom načina primjenjenih u aseptičkim načinima rada i/ili rada u sterilnim ili čistim uvjetima. Činjenica da se cijela proizvodnja može provesti u sterilnim uvjetima znači da se glavni uzroci da sjeme bude ubijeno ili da ne proklija, to jest gljivično ili bakterijsko zagađenje sjemena, može izbjeći. Nadalje, konačan proizvod je također bitno slobodan od zagađenja i ne naginje raspadu sa zagađivačima koji imaju proteolitičku aktivnost. Stoga je sustav proizvodnje također posebno pogodan za proizvodnju farmaceutskih proizvoda koji zahtijevaju visoke higijenske standarde.

50 Izraz "iniciranje klijanja transgenskog sjemena dvosupnica" znači osiguravanje uvjeta pogodnih za klijanje. Po izboru on uključuje skladištenje, sušenje, sterilizaciju, dodavanje vode, dopunjujući sjeme uvođenjem regulacijskih čimbenika koji bilo podižu ili spuštaju kao i vanjskim hranjivim tvarima. Dopunjavači uključuju i fizikalna i kemijska sredstva. Vanjske hranjive tvari obuhvaćaju na primjer N- i/ili C-izvore, vitamine, minerale, elemente u tragovima itd. Čimbenici rasta, čimbenici koji započinju klijanje, poticatelji, čimbenici sposobni povećati neke i smanjiti neke postupke tijekom nove sinteze, uključujući na primjer biljne hormone, kao što su auksin i citokinin. Fizikalna sredstva uključuju na primjer svjetlosni bljesak ili osvjetljavanje kroz duže vrijeme, kao i sterilizaciju i/ili grijanje.

60 Izraz "sustav ekspresije" znači takvu DNK koja obuhvaća jednu ili više DNK sekvenci dekodirajući jedan ili više zanimljivih genskih proizvoda operabilno povezane sa sekvencama koje reguliraju ekspresiju, kao što su pojačivači, promotori i/ili terminatori. Sustav ekspresije je poželjno takav da je induciran ili može biti induciran tijekom klijanja sjemena, ali bitno miruje ili može biti umiren kada se biljka dvosupnica razmnožava i uzgaja u poljskim uvjetima. Poželjno, sekvence koje reguliraju ekspresiju obuhvaćaju promotor, koji se može nazvati "camera obscura" (tamna

komora) promotor, to jest promotor koji je potaknut ili aktiviran tijekom klijanja, kada se sjeme drži u neosvjetljenim uvjetima u tamnoj sobi. To ne sprječava uporabu osvjetljenja ili svijetla. Baš naprotiv izlaganje sustava proizvodnje sakupi-pretvori bljesku ili svjetlu može povećati proizvodnju genskog proizvoda koja nas zanima induciranjem i povećanjem aktivnosti posebnih promotora.

Sustavi ekspresije koriste takve regulacijske sekvence ekspresije koji su posebno aktivni u novim sintezama prolaznih proteina koji se nagomilavaju u supki tijekom inicijalizacije klijanja.

Rečeni inducibilan sustav ekspresije obuhvaća inducibilne regulatorske sekvence odabrane od regulatorskih sekvenci gena koji kodiraju prolazne proteine koji su na novo sintetizirani tijekom inicijacije klijanja i nagomilavanja u supkama i endospermi biljke.

Rečeni sustav ekspresije se može pripremiti odabirom pogodnih regulacijskih sekvenci. Način odabira obuhvaća stupnjeve

- (a) izolaciju ukupne RNK iz supki i/ili lišća dvosupnica;
- (b) pripremu cDNK iz rečene izolirane RNK amplifikacijom rečene RNK s jednim specifičnim primjerom biljke i primjerom specifičnim za protein koji je na novo sintetiziran tijekom inicijalizacije klijanja i nagomilavanja u supkama i endospermi biljke;
- (c) sakupljanje i nanašanje klonova s cDNK;
- (d) upoređivanje rezultata s klonovima dobivenim iz RNK dobivene iz lista; i
- (e) ponovno dobivanje klonova koji obuhvaćaju cDNK pokazujući povećanu aktivnost kod prokljalog sjemena dvosupnica.

Izraz "genski proizvod" u sadašnjem izumu znači proteine, polipeptide, uključujući i strukturalne proteine i/ili enzime. Uobičajeno, "genski proizvod" je peptid koji obuhvaća najmanje dvije aminokiseline povezane skupa peptidnom vezom. Peptidi koji obuhvaćaju 2-10 aminokiselina se nazivaju oligopeptidima, gdje peptidi koji obuhvaćaju više od 10 aminokiselina se nazivaju polipeptidi. Polipeptidi mogu biti poliaminokiselinski lanci, kao što je polilizinski lanac koji se sastoji samo iz molekule lizina, ali također može biti protein, kompleks proteina ili dio ili dijelčić proteina.

Kao što je rečeno u prethodnom odlomku, izraz "genski proizvod" također može značiti proizvod temeljen na nukleotidima, kao što je mRNK. Također su uključene u izraz i ostale željene biokemikalije, spojevi ili tvari, koje se mogu dobiti na primjer postupcima biotransformacije, u kojima jedan ili više genskih proizvoda nazočnih u pripremcima izvedenim iz sjemena iz sadašnjeg izuma djeluju kao katalizatori kada se stave u dodir sa supstratom koji obuhvaća spoj ili tvar koja se može transformirati u željeni proizvod ili transformirati genski proizvod na željeni način.

Na drugi način, "derivati genskih proizvoda" se mogu dobiti postupcima transformacije, u kojima su jedan ili više originalnih "genskih proizvoda" sadašnjeg izuma modificirani dozvoljavajući reagensu nazočnom u supstratu da ih modificira. Genski proizvodi se mogu načiniti stabilnijima ili djelotvornijima mijenjanjem njihove sekundarne i/ili tercijarne strukture, na primjer presavijanjem ili odvijanjem aminokiselinskog lanca, uklanjajući ili dodavajući dijelove za kompleksiranje, ili dodavajući strukture ili supstituente rečenim genskim proizvodima. Takvi "derivati genskih proizvoda" su također uključeni unutar izraza "genski proizvodi" sadašnjeg izuma. Uobičajeno, genski proizvodi proizvedeni postupkom sadašnjeg izuma su heterologni strani proteini. To znači da "genski proizvod" nije proizveden od divlje vrste biljke. Drugim riječima, nije prirodan biljki domaćinu. Prirodno, proizvodi prirodnog sjemena se mogu proizvesti uporabom postupka sadašnjeg izuma. Osobito je koristan za povećanje proizvodnje određenih farmaceutski korisnih prirodnih homolognih proizvoda izvedenih iz biljke.

Izraz "obnavljanje s ili bez nizvodnog procesiranja genskog proizvoda ekspresiranog s prokljalim transgenskim sjemenom dvosupnice" znači da se supnice koje uključuju presađnice mogu obnoviti tako da se odijele od tekućine koja ih okružuje s ili bez bilo kakvog nizvodnog procesiranja. Na drugi način, okružujući medij se obnavlja kao takav. Uskladištenost "pripravka izvedenog iz sjemena" se može poboljšati sušenjem, ekstrakcijom, filtriranjem, drobljenjem itd. Mnogi od tih načina se istovremeno koriste radi sprječavanja klijanja. Grijanje, sušenje, drobljenje, odijeljivanje, ekstrahiranje, tlačenje i filtriranje se uobičajeno primjenjuju za zaustavljanje klijanja prije opadanja brzine na novo sintetiziranja i/ili smanjenja koncentracije željenih genskih proizvoda. Zaustavljanje je važno, jer klijanje kada se dozvoli da traje predugo, počinje ponovno koristiti na novo sintetizirane željene proteine za proizvodnju ostalih tvari potrebitih za nastajajuću biljku.

Općeniti opis izuma

Uskladištene pričuve kod prokljalog sjemenja dvosupnica, koje uključuju oslobođene aminokiseline i ostale biokemijske supstrate, obuhvaćaju obnovljivu sirovinu izvornog entiteta, gdje ekspresija željenog transgena transkripcijskom regulacijom, djelujući u supki tijekom klijanja i nakon toga rastom sadnica, oblikuje proizvodnju (pretvori, engl. sink) entiteta. Stoga je sadašnji izum iznad svega povezan s proizvodnim sustavom koji obuhvaća dva entiteta, sakupljanje i pretvaranje, to jest dva odvojena stupnja, stupanj nagomilavanja sirovina i stupanj proizvodnje, u kojem je izvor sirovine uporabljen za na novo sintezu genskih proizvoda i njihovih izvedenica ili proizvoda modificiranih s genskim proizvodom od izvora sirovine dobivene u prvom stupnju sustava proizvodnje.

Cilj sadašnjeg izuma je otkriti novi postupak temeljen na sustavu proizvodnje za proizvodnju genskih proizvoda kod sjemenja dvosupnica. Sustav proizvodnje obuhvaća dva odvojena stupnja. Prvi stupanj je korištenje raznolikih obnovljivih izvora sirovine, kao što su protein i ulje, koji se nagomilavaju u uskladištenim pričuvama biljke dvosupnice tijekom uzgoja i koji se po izboru mogu sakupiti u obliku sjemenja. Drugi stupanj obuhvaća mobilizaciju uskladištenih pričuva kod prokljale transgenske biljke za proizvodnju jednog ili više genskih proizvoda sa na novo sintezom željenog genskog proizvoda s ili bez dodavanja suplemenata kao čimbenika prehrane i osiguravajući fizikalna i/ili kemijska sredstva kao i genetički inženjering za induciranje klijanja i regulirajući na gore i/ili dolje na novo sinteze koje uključuju transkripciju, ekspresiju i/ili sekreciju.

Sadašnji izum koristi u svom prvom stupnju raznolike uskladištene pričuve koje obuhvaćaju proteine, ulja i/ili ugljikohidrate, nazočne u dvosupnicama, ali ih nema u monosupnicama, u kojima uskladištene pričuve uglavnom obuhvaćaju dva srodna oblika škroba, amilozu i amilopektin. Kod monosupnica se škrob mobilizira amilazama tijekom klijanja i neposrednim rastom sadnice koja nastaje. Nastala sahara je uporabljena kao izvor energije i ugljikovih spojeva, ali sirovina za na novo sintezu, osobito proteina, je mnogo oskudnija nego kod dvosupnica što čini prokljalo sjeme dvosupnice neusporedivo izvrstnim sustavom proizvodnje sakupi-pretvori.

U sadašnjem izumu je transgensko sjeme dvosupnica sakupljeno na polju, preveženo i uskladišteno kao obično. Valjanost uskladištenog sjemenja se može održavati kroz duge periode, obično do nekoliko godina. Temperatura i sadržaj vlage u sjemenu su glavni čimbenici u određivanju valjanosti tijekom skladištenja. Općenito je sjemenje uskladišteno kod temperatura između 0-5°C. Normalan sadržaj vlage uskladištenog sjemenja je 4-10%. Ukoliko je sadržaj vlage manji od 20% sjeme diše i nastaje toplina. Ukoliko su uvjeti prozračivanja loši, nastala toplina može ubiti sjeme. Ukoliko je sadržaj vlage preko 20% to može rezultirati u deterioraciji sjemenja mikrobiološkim rastom.

Zrelo sušenje je normalna pojava kod razvoja sjemenja tijekom kojeg sjeme prelazi u metabolički umireno stanje. Međutim sjeme mnogih vrsta može klijati bez sušenja. Sjeme rajčice može prokljati kada se uzme iz razrezanog voća i smjesti u vodi. Kod nekoliko ostalih vrsta uključujući *Brassica campestris*, sadržaj škroba brzo opada i koncentracija određenih šećera i oligosaharida se povećava tijekom sušenja sjemenja. Također se određeni hidrofilni proteini ekspresiraju jače kod osušenog sjemenja. Oni imaju mogućnost privlačenja vode i smatra se da igraju važnu ulogu u zaštiti protiv štetnih učinaka sušenja. Zrelo suho sjeme može ostati sposobno klijati i biti uskladišteno od dana do mnogo godina. Sirova neoblikovana sirovina, sjeme dvosupnice, se može uskladištiti do nekoliko godina.

Kod sjemenja dvosupnica su triacilgliceroli glavni oblik uskladištenja lipida uskladištenih u subcelularnim organelama kao uljna tijela. Sadržaj ulja u sjemenu može biti tako visok kao što je 64% kod ricinusa ili 48% kod sjemenja repice. Uskladišteno ulje je sintetizirano iz sahara koja dolazi iz razvijajućeg sjemenja. U citosolu je sahara pretvorena u heksozofosfat, koja je premještena u plastide ili pretvorena u glicerol-3-fosfat (glicerolski kostur). Kod plastida se masne kiseline sintetiziraju počevši od heksozofosfata, malata i acetata. U endoplazmatskom retikulu (ER) se glicerinski kostur i masne kiseline esterificiraju da bi se dobili triacilgliceroli.

Kod biljaka dvosupnica većina aminokiselina prebačenih u fhloem su glutamin i asparagin. U ovojnici sjemenja, prije premještanja u supke, dio glutamina i asparagina je pretvoren u druge aminokiseline. U supkama su aminokiseline uporabljene za sintezu proteina za skladištenje koji su pakirani u proteinska tijela. Rano kod razvoja sjemenja stanice supke sadržavaju jednu ili dvije velike vakuole koje se kasnije napune s proteinom za skladištenje i stupnjevito se razdijele radi oblikovanja jasnih i diskretnih manjih proteinskih tijela. Obično sjeme dvosupnice sadržava dva ili više različitih proteina za skladištenje. Na primjer, *Brassica campestris* ima ukupan sadržaj proteina od 24%, sadržavajući na primjer 2S albumin, napin, 11S globulin i kruciferin. Od ukupnog sadržaja proteina u sjemenu napin predstavlja 20% i kruciferin 60%. Omogućeno (olakšano) je iskoristiti gene koji kodiraju rečene proteine u sadašnjem izumu.

Proteini za skladištenje su općenito kodirani s multigenskim obiteljima. Uobičajena osobina za proteine luminalnog endoplazmatskog retikuluma eukariota je konzervirani karboksi-terminalan tetrapeptid KDEL, koji služi kao ER-retencijski znak i uvijek se pronalazi na krajnjem karboksilnom kraju. Ne postoje dokazi da je konzerviranje više od četiri aminokiseline potrebno (Pelham, H.R.B., TIBS 15:483-486, 1990), premda se tvrdilo da sastav kiselinjskih ostataka između terminalnih 20 aminokiselina može imati neku važnost za djelotvornu retenciju (Wandelt, C.I. i ostali,

Plant J., 2:181-192, 1992). Predloženi mehanizam retencije je vjerojatno receptorski i uključuje vezivanje KDEL-signalna na membranski receptor i brzi povratak signal-receptor kompleksa u ER, ukoliko je on oslobođen kao vezikula (Pelham, H.R.B., TIBS 15:483-486, 1990).

- 5 Genetski modificirani proteini se ne mogu uvijek pronaći u njihovom prirodnom staničnom odjeljku. Na primjer visoko-Met fazeolin ekspresiran u transgenskom duhanu je naden samo u ER (endoplazmatskom retikulumu), Golgijevim cisternama i Golgijevim vezikulima. Normalno se fazeolin akumulira u matriksu vakuola za uskladištenje proteina sjemenja duhana u razvoju. Rezultati ukazuju da je visoko-Met fazeolin razgrađen bilo u Golgijevim vezikulima ili upravo nakon ulaska u vakuole za uskladištenje proteina (Hoffman, L.M. i ostali, Plant Mol. Biol. 11:717-730, 1988). Visoki stupanj akumulacije proteina za skladištenje vicilina iz sjemena *Vicia faba* s dodatnom karboksi-terminalnom KDEL-sekvencom je izvješten s duhanom i alfaalfa (Wandelt, C.I. i ostali, Plant J. 2:181-192, 1992). Modificirani genski konstrukti fuzirani s 35S-promotorom mozaičkog virusa cvjetače i proteinom su nakupljeni u (ER) lišću transgenskih biljaka. Prema tome se čini mogućim, da kada se genetički modificirani proteini za skladištenje proizvedu, retencija u ER može spriječiti degradaciju i da se DNK konstrukti s 35S-promotorom mozaičkog virusa cvjetače može primjeniti u sadašnjem izumu.

- 20 Kruciferin je heksamer od šest podjedinica od kojih svaka sadrži jedan lanac kodiran jednim genom (Rödin, J. & Rask, L., Physiol. Plant. 79:421-426, 1990). Na primjer kod *Brassica napus* geni kruciferina dijele približno 60% homologije između članova. Napin je drugi najprominentniji protein iz sjemena u *Brassica napus*. Poput kruciferinskih podjedinica, napin je produkt jednog gena sastavljen od dva različita polipeptidna lanca povezanih skupa s disulfidnim mostovima. Oba, i kruciferin i napin su sintetizirani na membrani ER kao prekursori koji sadržavaju ER-ciljajući znak (Ericson, M.L. i ostali, J. Biol. Chem., 261:14576-14581, 1986).

- 25 Kako je spomenuto ranije, oba i kruciferin i napin sadrže ER-ciljajući znak sekvencu na svojim N-terminalnim krajevima. Proteini ulaze u ER u nesmotanom stanju i signalna sekvenca je odcijepljena ubrzo nakon ulaska. Posljednjih godina je postalo jasno da nisu svi proteini koji ulaze u ER dalje procesirani i pakirani u vakuole. ER također sadržava veliki broj proteina koji ostaju u lumenu i pomažu inicijalnim stupnjevima kod zrenja sekretornih proteina. Mnogi od tih proteina su također karakterizirani također i u sustavima sisavaca (Pelham, H.R.B., TIBS 15:483-486, 1990), sugerirajući da je glikozilacija genskih proizvoda, osobito proteina slična kod sisavaca kao i kod biljaka. Kod biljaka je 30 pokazano da je na primjer auksin-vezajući protein zadržan u ER (Inohara, N. i ostali, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3564-3568, 1989).

- Obično je prva skupina proteinaza koje se pojavljuju tijekom klijanja SH-ovisna proteinaza koja djeluje na netopive prirodne proteine za skladištenje. Kod *Vigna mungo* sinteza SH-ovisne proteinaze u supkama je inicirana neposredno nakon natapanja i povećava se do dana 4 nakon kojega opada (Okamoto, T. & Minamikawa, T., J. Plant Physiol., 152 (6): 675-682, 1998). Peptidi kratkih lanaca koji rezultiraju iz djelovanja endopeptidaze su odcijepljeni od prirodnih (prirodnih) proteina, što povećavaju njihovu osjetljivost prema ostalim proteinazama.

- 40 Druga skupina proteinaza su inaktivne prema prirodnim proteinima za skladištenje, ali hidroliziraju peptide kratkih lanaca u oligopeptide. Istovremeno su karboksipeptidaze također aktivirane i aminokiseline su oslobođene iz peptida. Ova proteoliza se događa u proteinskom dijelu iz kojeg su oligopeptidi i aminokiseline oslobođaju u citozol, gdje se oligopeptidi razgrađuju dalje u aminokiseline s amino- i di- ili tri-peptidazama. Oslobođene aminokiseline iz organa za skladištenje su dalje metabolizirane u glavni oblik aminokiselina za transport, asparagin i glutamin. Proteini za skladištenje predstavljaju izvor aminokiselina za na novo sintetizirane proteine tijekom klijanja.

- 45 Drugi stupanj postupka sadašnjeg izuma obuhvaća klijanje u kojem je sirovina nakupljena tijekom uzgoja u uskladištene pričuve sjemena dvosupnice mobilizirana za proizvodnju željenog genskog proizvoda. Povećavanje vremena za klijanje je brzo i niskih troškova. Zapremnina proizvodnje je praktički neograničena kako se sirovina može dobiti iz obnovljivih izvora i zahtjevani ulaz energije se dobiva od sunca.

- 50 U sadašnjem izumu, klijanje znači razvojni događaj koji počinje s uzimanjem vode od sjemena dvosupnice i povećanjem respiracije i makromolekularnih sinteza, mobilizacijom uskladištenih pričuva i subcelularnim strukturalnim promjenama. Fiziološki, klijanje je kratak događaj koji okončava s početkom produžetka embrionske osi. U sadašnjem izumu klijanje uključuje također fazu rasta nakon početka produživanja embrionske osi. Sjeme upija obično ne više od dva do tri puta težine suhog sjemenja, ali je kasnije u razvoju sadnica potrebno još vode. Klijanje sadržava brojne događaje kao što je povećana respiracija i makromolekularne sinteze i subcelularne strukturalne promjene. Klijanje je općenito završeno s radikalnim proširenjem koje se pojavljuje proširenjem stanice bez podjele stanice. Postoje dvije vrste presadnica klasificiranih prema sudbini supke nakon klijanja. Kod hipogealne vrste rasta presadnice, supka ne izlazi iz zemlje s razvojem presadnice. Hipokotil ostaje kratak ali se epikotil proširuje i stvara prve prave listove izvan zemlje. Kod epigealne vrste presadnica rast supki se povećava proširenjem hipokotila. Supke obično postanu 60 fotosintetski aktivne prije nastanka pravih listova.

Kada sjeme klija u prirodi ili na polju ono koristi zalihe supke za početak fiziološke aktivnosti općenito nakon mirnog stupnja kao suhog sjemena. Vitalne funkcije se brzo povećavaju uključujući i ekspresiju gena. Značajne količine aminokiseline i ostalih bioloških spojeva se oslobađaju iz uskladištenih pričuva supke tijekom klijanja i neposredno se vežu tijekom rasta presadnice.

Klijanje također može biti inicirano s površinski steriliziranim sjemenom inkubiranjem sjemena u vodi ili vodom dopunjenom sa spojevima dobrim za proizvodnju željenog genskog proizvoda. Tijekom klijanja je aktivirana ekspresija gena radi proizvodnje željenog genskog proizvoda. Za iniciranje klijanja, sjemenje je prvo hidratirano do sadržaja vlage od 40-50% natapanjem u posude s vodom gdje je temperatura podešena prema vrsti sjemena i zračenje je organizirano s kompresiranim zrakom. Nakon natapanja, sjeme se premješta na klijanje uobičajeno u 100% vlažne prostorije. Tipično je temperatura između 10-30°C i raspon vremena od 2 do 10 dana, poželjno 3 do 6 dana, najpoželjnije 4 do 5 dana.

U sadašnjem izumu prokljalo sjeme dvosupnice obuhvaća transgensku supku, to jest supke biljaka dvosupnica koje su postojano transformirane s DNK sekvencom koja dekodira željeni genski proizvod. Supke su dio embrija i one služe kao organ za skladištenje. Fiziološka struktura i različitost vrsta stanica je relativno jednostavna kod supke. Mobilizacija glavnih uskladištenih pričuva supke počinje nakon klijanja. U supkama su tri glavna oblika uskladištenih tvari, proteini, ulja i ugljikohidrati enzimatski prevedeni u oblik prikladan za transport tijekom rasta presadnice. Uskladišteni proteini su razdijeljeni stupnjevito sa serijom proteinaza ekspresiranih u stanicama supke. Proteinaze su sintetizirane na novo strukturalnim genima reguliranim s promotorskim područjem koji djeluje u supki.

Tijekom klijanja i neposrednog rasta nakon njega mobilizacija pričuve uskladištenih lipida presadnice u nastajanju je inicirano lipolizom u uljnim tijelima što daje glicerol i slobodne masne kiseline od triacilglicerola. U stanici klice za skladištenje glicerol i slobodne masne kiseline su pretvorene u saharozu u kompleksnim reakcijama koje uključuju tuceta enzima i najmanje glioksisom i mitohondrijalne organele. Saharoza je premještena u vakuole ili embrio.

U mobilizacijskom/proizvodnom stupnju nakupljeni pričuveni protein, ugljikohidrat i lipid su uporabljeni kao izvor početne tvari i pretvoreni su u trgovački zanimljive proizvode umjesto normalnih proteina proizvedenih za oblikovanje biljke. Mobilizacija počinje dodavanjem sjemenju okružujuće tekućine, polukruti ili kruti medij, koji obuhvaća vodu, koja je opskrbljena s po izboru fizikalnim ili kemijskim sredstvima koja uključuju hranjive tvari, za klijanje inducirajuće čimbenike kao i čimbenike sposobne povećati i/ili smanjiti regulaciju određenih stupnjeva u proizvodnji (transkripcija, ekspresija i/ili izlučivanje). Ova mobilizacija inicira klijanje i proizvodnja se nastavlja do pojave zelenog lišća.

Kontaminacija je poznata kao ozbiljan problem u fermentacijskoj tehnologiji. Značajan dio (20-25%) fermentacijskih posuda je kontaminirano kod proizvodnje na industrijskoj skali. Također i postupci koji koriste svježju biljnu tvar kao što je proizvodnja krumpirovog škroba ili mokrog mljevenja kukuruza također imaju problem s rastom mikroba tijekom postupka. Svježja biljna tvar kao što je lišće požnjeveno s polja je glavni izvor kontaminacije koja može uzrokovati ozbiljan gubitak na konačnom proizvodu.

Sadašnji izum opisuje sustav koji koristi suho sjeme kao sirovinu. Postoji samo ograničena ekspresija stranih gena u polju, dok se ekspresija uglavnom provodi sigurno za okolinu u reguliranim uvjetima u tvornici umjesto u uvjetima na polju. Suho sjemenje dvosupnica se može površinski sterilizirati lakše od monosupnica jer one obično imaju čvrstu, glatku ovojnicu sjemena za razliku od zrna monosupnice.

Sterilizacija se može provesti tretiranjem s kemikalijama kao što su hipoklorit, vodikov peroksid ili s ostalim spojevima za dezinfekciju. Kako sjeme dvosupnica ima glatku površinu za razliku od naborane površine sjemena monosupnica, sterilizacija sjemena dvosupnica je mnogo djelotvornija. Posljedično, proizvodnja željenog stranog ili prirodnog genskog proizvoda se može provesti pod sterilnim uvjetima, što je velika prednost osobito kada je ciljani genski proizvod terapijski aktivan protein, ali također i zbog toga što se može izbjeći degradacija konačnog proizvoda mikrobiološki.

Genski proizvod se može dobiti bitno bez kontaminacije, bilo kao pripravak izveden iz sušenog biljnog sjemena koji obuhvaća jedan ili više genskih proizvoda nakupljenih tijekom klijanja transgenskog sjemena dvosupnice, poželjno obnovljenog kod točke maksimalnog nakupljanja prekidanjem postupka klijanja. Genski proizvod se može obnoviti nizvodnim postupkom smjese prokljalog sjemenja dvosupnica ili u stabilnom obliku za skladištenje. Pripravak obuhvaća na primjer proteine, enzime, peptide, hormone, faktore rasta, cjepiva, aminokiseline, vitamine i/ili antibiotike.

Sadašnji izum koristi takav upravljački sustav ekspresije gena za vođenje sinteze prema proizvodnji željenog genskog proizvoda i koristi aminokiseline, ugljikove spojeve i ostale genske proizvode koji se oslobađaju tijekom inicijalizacije klijanja kao izvora sirovine za na novo sintezu transgenskog proizvoda. Prirodni ili prirodni genski proizvodi, na primjer proteinaze, lipaze, amilaze itd. nastale kod prokljalog sjemenja se mogu koristiti kao supstrati za transgenske enzime ili za oblikovanje željenih biokemikalija.

U sadašnjem izumu cilj je osigurati transgensku biljku koja pruža najmanje jedan sustav ekspresije koji obuhvaća barem jednu DNK sekvencu koja dekodira najmanje jedan željeni genski proizvod funkcionalno kombiniran sa sekvencama koje reguliraju ekspresiju, koja je inducirana ili može biti inducirana tijekom klijanja i bitno miruje ili može biti umirena kada transgenska biljka dvosupnica raste u uvjetima polja. Promotori koji su aktivni u mraku (neosvjetljeni uvjeti), ovdje tako zvani tamna komora promotori, uključujući manje ili više o svjetlu neovisne Rubisco promotore, su korisni u sustavu ekspresije sadašnjeg izuma.

Sadašnji izum osigurava mogućnosti proizvodnje različitih željenih genskih proizvoda, ali također i ostalih negenskih biokemikalija. Transgen eksresiran tijekom klijanja proizvodi prvi genski proizvod, RNK, iz kojega se mogu dobiti ostali RNK proizvodi kao takvi ili nakon transformacije. Obično je stupanj RNK kratkotrajan i dobiveni genski proizvod je proteinasti proizvod. U načelu postoje dvije vrste proteinskih proizvoda, enzimski i neenzimski proizvodi, koji su često strukturalni proteini, cjepiva, hormoni itd. Enzimi su sposobni modificirati endocelularni supstrat koji se može dobiti iz biljaka, koji je transformiran u željeni biokemijski spoj. Na drugi način, ekstracelularni supstrat je dodan i može biti transformiran da bi se dobio drugi biokemijski spoj. Neposredno nakon toga, protein, ovisno da li je enzimski ili neenzimski aktivan protein, se može dovesti u dodir s reagensom u kojem slučaju se dobivaju derivati proteina.

U sadašnjem izumu su heterologni strani geni ili DNK sekvence dizajnirane za optimalnu ekspresiju proklijalih supki biljke dvosupnice. Osobine sekvence između biljnih gena i heterolognih gena su provjerene s ciljem ekspresije stranih transgenskih gena od heterolognih izvora. Kod biljaka je korisno uporediti strukturu tih gena s poznatim biljnim genima. Pionirski posao na tom polju je načinjen s *Bacillus thuringiensis* endotoksičnim genima (*cry*). Mora se načiniti nekoliko modifikacija u originalnoj skvenci gena s ciljem povećanja ekspresije AT bogatih *cry* gena kod biljaka.

Poželjni transkripcijski početak sekvence kod biljaka je AACAA ATG G (veoma konzervativni položaji nukleotida su pokazani podebljano). Od zaustavljajućih kodova TGA, TAG i TAA, prvi ima laganu prednost i TAA se rijetko koristi kod monosupnica. Kodovi u sekvenci gena se mogu pretvoriti u odgovarajuće kod biljaka prema tablici uporabe kodova. Pretvorena DNK sekvencija bi trebala biti ispitana na nazočnost putativnih središta koji smanjuju ekspresiju kod biljaka. Putativne sekvence poliadenilacijskog znaka kod biljaka su uobičajeno AATAAA, AATAAT, i njihove inačice: AACCAA, ATATAA, AATCAA, ATACTA, ATAAAA, ATGAAA, AAGCAT, ATTAAT, ATACAT i AAATA (najkonzervativniji A nukleotidi su označeni podebljano). Putativne spojnice isključene iz sekvence gena su bile CAN₇₋₉AGTNN. Dodatno, DNK sekvencija bi trebala biti lišena ATTAA sekvence, koja je putativni mRNK degradacijski element.

Transkripcijske terminatorske sekvence se mogu dobiti od različitih gena ekspresiranih u sjemenu ili ostalim genima biljke, na primjer od *Rubisco* gena. Terminatori od različitih bakterija, na primjer od *Agrobacterium* se mogu koristiti kao i *nos* geni ili *ocs* geni. *Nos* geni dekodiraju nopal sintazu (Depicker, A. i ostali, (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-573 ; Shaw, C.H. i ostali, (1984) Nucl. Acids Res. 12:7831-7846; i An, G. i ostali, (1986) Mol. Gen. Genet. 203:245-250). *Ocs* gen dekodira oktopin sintazu (Koncz, C. i ostali (1983) EMBO J. 3:1597-1603. Dhaese P. i ostali, (1983) EMBO J. 2:419-426).

RNK polimeraza II transkribira protein kodirane gene kod biljaka na bitno isti način kao u ostalim eukariotskim organizmima. Na općenitoj razini vrlo slični regulacijski mehanizmi se mogu naći u transkripciji inicirajućih regija (promotor) kod eukariotskih stanica. TATA pretnac je smješten 25-40 nukleotida uzvodno od transkripcijskog inicirajućeg mjesta i translacijskog inicirajućeg kodona, ATG je smješten 40-80 nukleotida nizvodno od transkripcijskog inicirajućeg središta. U zreloj mRNA neki otvoreni čitajući okvir slijedi ATG kodon i okončava s jednim od tri zaustavljajuća kodona, UGA, UAG ili UAA.

Promotori iz različitih izvora se mogu koristiti za transgensku ekspresiju kod biljaka. Mnogi od njih su iz *Agrobacterium ssp.* i iz biljnih virusa kao konstitutivno ekspresiranog *Agrobacterium nos* promotora i promotora 35S mozaičkog virusa cvjetače. Promotori specifični na tkivo su korisni za primjene gdje je ekspresija kod specifičnog tkiva potrebna. Promotori specifični za tkivo su obično također razvojno nadzirani tako da su aktivni samo kod određenog razvojnog stupnja tkiva. U sadašnjem izumu je poželjno da je promotor specifičan na proklijalo sjeme.

Rubisco (ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza) predstavlja do 50% ukupnog proteina kod proklijale supke. On je najrašireniji biljni protein koji katalizira reakcije, gdje se CO₂ molekula kondenzira s ribuloza-1,5-bisfosfatom da bi nastale dvije molekule 3-fosfoglicerata. Rubisco je smješten na površini strome tilakoidnih membrana. Enzim se sastoji iz osam velikih podjedinica, dekodiranih genomom kloroplasta, i osam malih podjedinica. Mala podjedinica je dekodirana s obitelji nuklearnog multigena (*rbcS* geni). Mala podjedinica je sintetizirana na citoplazmatskom polisomu kao prekursor proteina. Prmještena je u plastide i procesirana prije sklapanja holoenzima. Ekspresija *rbcS* gena je specifična na tkivo i i razvojni stupanj i nadzirana je sa svjetlom sa sustavom fitokroma.

U sadašnjem izumu najpoželjniji genski proizvod ili sustav proizvodnje proteina koristi promotor Rubisco gena male podjedinice. Promotori Rubisco gena male podjedinice se mogu izolirati iz supki *Brassica campestris* raslih u mraku

(tamna komora) ili neosvjetljenim uvjetima. Ova vrsta promotora može proizvesti strane proteine kod vrlo visoke razine. Naš rad je pokazao da oko 50% svih *de novo* sintetiziranih proteina u mraku prokljalih supki *B. campestris* su male i velike podjedinice Rubisco. mRNK razina prirodnog *RbcS* genskog transkripta je oko 500 pg po µg ukupne RNK kod prokljalog sjemena. Maksimalna ekspresija je dostignuta oko 60 sati nakon početka natapanja. Slični rezultati su pokazani s mRNK razinama prirodnog *RbcS* genskog transkripta iz *Brassica napus* (Fiebig, C. i ostali, Bot. Acta 103 (3):258-265, 1990). Prokljalo sjeme može biti osvjetljeno s vidljivim svjetlom kroz kraće ili duže vrijeme radi povećanja ekspresije. Mono-, di- ili oligosaharidi, poželjno saharoza ili glukoza se mogu dodati da obuzdaju prirodnu *rbcS* promotorsku aktivnost. Ukoliko se dio koji reagira na saharozu ukloni iz transgenskog promotora on neće biti obuzdan sa saharozom. Kada se proizvede manje Rubisco enzima ostaje više slobodnih aminokiselina za transgensku ekspresiju. Također se mogu koristiti antisensne tehnologije za regulaciju na dolje ekspresije endogenog *rbcS* gena: ekspresiranjem antisensa *rbcS* gena u prokljalo sjeme.

Pošto je Rubisco najvažniji biljni protein, on je korišten kao poželjni promotor u sadašnjem izumu, ali sustav ekspresije sadašnjeg izuma nije ni na koji način ograničen na korištenje rečenog promotora. Transgenska supka koja ima prednost za proizvodnju proteina obuhvaća sustav promotora za proizvodnju proteina i uključuje poželjno svjetlosno inducibilni Rubisco promotor visoko aktivan u supkama. Moguće je proizvesti ostale visoko ekspresirajuće Rubisco promotore pretraživanjem Rubisco cDNKe ekspresirane u supkama osobito u neosvjetljenim uvjetima. cDNKe mogu se proizvoditi s RT-PCR uporabom oligo-T-početnika i sekvenci od 5'-kraja kodirane sekvence visoko sačuvanog Rubisco. U supkama visoko ekspresirajuća cDNKe mogu biti sekvencionirane i promjenljivo 3' netranslatirano područje (UTR) se može koristiti kao proba za detekciju razina ekspresije kod biljnih organa. Korištenje baze podataka cDNK sekvence i promotora koji ekspresiraju bitno samo u supkama mogu biti izolirani uporabom nekoliko načina. Na sličan način je moguće koristiti cDNK informacije radi osiguranja ostalih bitno na sjeme specifičnih i klijanjem aktiviranih i/ili inducibilnih promotora, ovdje nazvanih promotora tamne komore.

Mnoge proteinaze i lipaze su ekspresirane specifično u supki prokljalog sjemena. Jedna od najbolje karakteriziranih je *Vigna mungo* sulfhidril-endopeptidaza (SH-EP), koja je sintetizirana *de novo* u supkama odmah nakon namakanja. Općenito, količina SH-EP mRNK se povećava do trećeg ili četvrtog dana. Područje SH-EP promotora (broj banke gena: EMBL X51900) je fuziran s GUS genom da olakša mjerenje razine ekspresije tijekom klijanja sjemena dvosupnice.

Dodatno promotorima koji su regulirani u tkivu na specifičan način, mogu se koristiti inducibilni promotori, koji se mogu aktivirati različitim stimulansima. Razred gena poznatih kao geni toplotnog udara ili stresni geni se pojavljuju u svim organizmima od bakterije do čovjeka. Transkripcija ovih gena je inicirana slijedeći tretman stresa (na primjer toplotni udar) i translacija transkripata proizvodi proteine koji vjerojatno zaštićuju stanicu privremeno. Proizvodnja mRNKe toplotnog udara i proteina je samo privremena pojava i ekspresija gena toplotnog udara se nakon nekoliko sati stabilizira i zatim opada. Ukoliko se temperatura povećava polako, a ne najednom, organizam može podnijeti temperature koje bi inače bile smrtonosne, to jest organizam se može prilagoditi višim temperaturama. Prokljalo sjeme se može grijati radi povećanja aktivnosti promotora toplinskog udara. Za razinu mRNK sojinog toplotnog udara (HS) je pokazano da se povećava od jedva određive razine pa sve do 15 000-20 000 kopija nakon dva sata tretiranja kod 40°C. Područje promotora HS je opisano u US 5,447,858 se također može koristiti u sustavu ekspresije sadašnjeg izuma kao inducibilni promotor. Promotor HS kloniran s PCR je fuziran s GUS genom radi mjerenja razine ekspresije tijekom klijanja sjemena.

Nekoliko vrsti hidrolitičkih enzima je sintetizirano *de novo* i djelovalo je kod prokljalog sjemena gdje su uskladištene pričuve mobilizirane. Pretvorba uskladištenih pričuva u oblik koji se može transportirati kao triacilglicerol u saharozu uključuje nekoliko visoko ekspresiranih gena kao izocitrat liazu i malat dehidrogenazu. Promotori iz tih gena se mogu koristiti za transgensku ekspresiju. Salicilat inducibilni promotor iz duhana, *Nicotiana tabacum*, se može klonirati uporabom PCR. Može se koristiti za ekspresiju heterolognih gena kod prokljalog sjemena.

Velika prednost glede okoliša sadašnjeg izuma je ta što strani geni nisu ekspresirani tijekom uzgoja na polju. Gen je umnožen i sakupljen skupa s uskladištenim pričuvama, gdje se klijanjem ograničena ekspresija proizvodnje stranog gena može provesti u graničnim uvjetima.

U načelu, bilo koji trgovački zanimljiv proizvod se može proizvesti sa sadašnjim izumom. Ovi genski proizvodi uključuju enzime, koji su heterologni prema biljki. Drugim riječima, oni nisu prirodni biljnim vrstama u kojima su proizvedeni. Također su uključeni enzimi, homologni prema biljkama u kojima se proizvode. Rečeni homologni enzimi su općenito preekspresirani korištenjem tehnika rekombinantne DNK. Zanimljivi enzimi uključuju, ali nisu ograničeni na, hidrolaze, kao što su proteaze, β-glukanaze, celulaze, hemi-celulaze, fosfataze, lipaze, fosfolipaze, pektinaze, amilaze, amiloglikozidaze, lizozime, pululanaze i hitinaze, peroksidaze kao i liaze kao što je pektinoliaza i izomeraza, kao što je glukoza izomeraza.

Također je moguće proizvesti strukturalne proteine s postupkom i sustavom proizvodnje sadašnjeg izuma. Neke zanimljive izvedbe sadašnjeg izuma su na primjer kolagen, želatina, spidroin, svileni protein, ali također i mnoge druge

vrste proteinastih genskih proizvoda se mogu proizvesti, uključujući inhibitore enzima, kao što je inhibitor tripsina, terapijske peptide kao interferone, insulin, neuropeptide, enkefalin, somatostatin itd. Također se mogu proizvesti i ostale poliaminokiseline, kao što su polilizin i poliglutamat, isto kao i vlakna, membrane, prevlakači, terapeutici ili lijekovi, antiskalanti ili hrana/prehrana aditivi i cjepiva, kao što je LTB i faktori rasta, kao što je GM-CSF. Također se mogu sintetizirati neproteinasti genski proizvodi uključujući poli- β -hidroksi-butilat.

Kako je *de novo* sinteza tijekom klijanja brzo prolazeća prolazna situacija, klijanje se mora prekinuti ili okončati prije nego što količina željenog genskog proizvoda počne opadati. To se može postići obnavljanjem željenog genskog proizvoda prije nego li njegova koncentracija opadne, zaustavljanjem klijanja bilo grijanjem, codin-N₂ (pečenjem) ili na drugi način, drobljenjem ili izrezivanjem proklijalog sjemenja dvosupnice uključujući presadnice. Ukoliko se klijanje prekine grijanjem, željeni genski proizvod se može odvojiti kao sirovi osušeni proizvod, s dobrom mogućnošću skladištenja, što znači da se enzim može unijeti isto tako u sirovi stabilni oblik za skladištenje. Sinteza željenog proteina se također može zaustaviti na svom vrhuncu drobljenjem ili izrezivanjem proklijalog sjemenja. Ukoliko je klijanje zaustavljeno izrezivanjem ili drobljenjem genski proizvod se može odvojiti kao sirova smjesa, može se koristiti kao takav ili se može procesirati nizvodno, to jest oblikovati, uskladištiti, i transportirati i uskladištiti. Poželjno se on upotrebljava kao takav u na primjer biotransformacijskim procesima. Prirodno se željeni genski proizvodi mogu izolirati i pročistiti uobičajenim dobro poznatim načinima.

Ukoliko se genski proizvod koristi za biotransformaciju, on se smješta u dodir sa supstratom, to jest određenim spojem ili smjesom spojeva, to jest genskih proizvoda, često je enzimima dopušteno da reagiraju sa spojevima u supstratu. Bilo da genski proizvod, na primjer enzim djeluje kao neki katalizator i modificira spoj(cve) u supstratu, ili na drugi način supstrat ili reagens sadrži najmanje jednu tvar ili spoj sposoban modificirati genski proizvod, na primjer mogu se promijeniti njegovi načini savijanja, može se provesti glikozilacija ili deglikozilacija ili se može osigurati sa supstituentom radi olakšanja konjugacije genskog proizvoda s ostalim proizvodima.

U sadašnjem izumu, nakon klijanja, u uvjetima gdje se željeni genski proizvod može proizvesti, supstrat je obogaćen s genskim proizvodom. Pripravak izveden iz sjemenja uključuje supke, hipokotile, korjen i u hipogealnoj vrsti biljaka također epikotil i ponekad malo prvo lišće. Genski proizvod se može ekstrahirati ili ostaviti u pripravku.

Genski proizvod može biti protein dekodiran s genom osiguranim sa sustavom ekspresije iz sadašnjeg izuma ili neki drugi biokemijski spoj proizveden transgenskim enzimom kada su prirodni genski proizvodi uskladišteni u sjemenju mobilizirani klijanjem i uporabljeni kao takvi i dozvoljeno im je djelovanje na ekzogeno dodani supstrat radi osiguranja željene (bio)transformacije supstrata.

Ukoliko je genski proizvod ekstrahiran iz pripravka, on se može koristiti bilo kao svjež ili u suhom obliku. Sušenje se može provesti u sušioniku kod 40 - 80°C ili u liofilizatoru kod -20 - -80°C. Suha tvar se može zdrobiti ili smrviti u prah. Prije ekstrakcije se pripravak može mehanički razbiti i/ili enzimski tretirati dovodeći ukupni protein u mulj ili otopinu. Celularni debrisi se tada može odijeliti na bilo koji uobičajeni način, kao što je centrifugiranje, taloženje i/ili filtriranje.

Supernatant ili filtrat će normalno obuhvaćati 1-40% težinski željenog genskog proizvoda od ukupnog proteina u mediju, poželjno najmanje oko 30% težinski. Kada željeni proizvod nije topiv u vodi, on se na primjer može ekstrahirati s pogodnim otapalom. Na drugi način, drugi postupak, koji dozvoljava renaturaciju ili topivost i/ili ekstrakciju proizvoda bez gubitka aktivnosti željenog proizvoda.

Nakon izolacije zanimljivog proteina iz vodenog medija, genski proizvod se može pročistiti na uobičajeni način. S obzirom da će genski proizvod obuhvatiti bitan dio ukupnog proteina nazočnog u smjesi, često bivajući najveći postotak od bilo kojeg pojedinačnog proteina, pročišćavanje je uveliko pojednostavljeno. Nadalje, zagađivači u proizvodu nakon pročišćavanja ne izgledaju da bi bili od fiziološke važnosti za bilo koju od primjena genskih proizvoda, uključujući terapijske primjene.

Ukoliko genski proizvod nije ekstrahiran iz pripravka nego je ostavljen u njemu, on se također može izdvojiti u svježem ili sušenom obliku. Sušenje se može provesti kako je gore opisano. Sušena tvar se može dalje zdrobiti ili pretvoriti u prah. Svježa tvar se može usitniti mehanički razbijanjem ili tretiranjem enzimom. Sušena i svježa tvar se može koristiti kao izvor genskog proizvoda. Ukoliko je genski proizvod enzim, mogu se dodati odgovarajući supstrati u vodenu smjesu ili u sušeni pripravak ili koristiti kao svježa tvar.

U jednoj izvedbi sadašnjeg izuma, proklijalo sjeme dvosupnica, supke i/ili presadnice koji obuhvaćaju jedan ili više zanimljivih proteina mogu se koristiti kao dodaci u prehrambenim proizvodima. Proklijalo sjeme dvosupnica se može miješati s normalnim netransgenskim sjemenjem radi dobivanja željene koncentracije genskog proizvoda od interesa u prehrambenim proizvodima za životinje.

Smjese ili pripravci izvedeni iz prokljalog sjemena se mogu sušiti i uskladištiti. Genski proizvodi se mogu izolirati ili ostaviti u tvari, kada je na primjer rekombinantni protein koristan u prehrambenoj primjeni. Genski proizvodi se mogu koristiti za povećanje proteinske vrijednosti životinjske prehrane ili to može biti na primjer hormon rasta ili cjepivo. Mogu se također proizvesti i nestabilne i otrovne tvari na strogo nadziran način, što povezuje djelotvornu proizvodnju proteina s ekološkim pogledima i interesima u poljoprivredi.

Izum je dalje opisan u više pojedinosti. Primjeri i eksperimentalne pojedinosti su otkrivene radi osiguranja povećanog razumjevanja i vođenja onih iskusnih u području.

PRIMJER 1

Ekspresija GUS gena u klijanju sjemena *Brassica campestris*

Ekspresija GUS je pokazana s histokemijskim testom. Četiri različita promotora su korištena za regulaciju ekspresije GUS. Uporabljivi promotori su promotor toplinskog udara soje, *Vigna mungo* promotor endopeptidaze, pr-promotor *Nicotiana tabacum* i CaMV 35S promotor. Sekvence promotora su proizvedene s PCR uporabom ukupne biljne DNK kao templa.

Promotori su vezani na GUS gen uporabom *NcoI* enzima. Promotor-GUS konstrukti su klonirani u biljnom transformacijskom vektoru, pGPTV-hpt (Becker i ostali 1992. Plant Mol. Biol. 20:1195-97) *B. campestris* je transformirana prema protokolu opisanom od Kuvshinov, V. i ostali (Plant Cell Reports 18:773-777, 1999). Transgenske biljke su rasle u stakleniku dok nisu proizvele sjeme. Transgensko sjeme je prokljalo i uporabljeno je za histokemijski GUS test.

Rezultati su opisani na Slikama.

Na lijevoj strani na Slici 1A je pokazano prokljalo sjeme transgenske *B. campestris* koje ekspresira GUS gen. GUS gen je vezan na promotor toplinskog udara soje. Na desnoj strani je pokazana netransformirana nadzorna presadnica.

Na Slici 1B je pokazano prokljalo sjeme transgenske *Brassica campestris* koje ekspresira GUS gen. GUS gen je vezan na promotor endopeptidaze.

Na Slici 1C je pokazano prokljalo sjeme transgenske *Brassica campestris* koje ekspresira GUS gen. GUS gen je vezan na inducibilni promotor salicilata.

Na Slici 1D je pokazano prokljalo sjeme transgenske *Brassica campestris* koje ekspresira GUS gen. GUS gen je vezan na 35S promotor.

Slika 2 pokazuje bezbojnu puferiranu otopinu koja sadržava supstrat β -glukuronid (100 μ g/mL) koji je djelovanjem GUS enzima proizvedenog prokljalim transgenskim sjemenom enzimatski pretvoren u plavo obojenu glukopiranoziduronsku kiselinu i aglikon.

Slika 3 pokazuje različite stupnjeve klijanja sjemena *Brassica campestris*, naznačeni kao dani nakon početka klijanja. Površinski sterilizirano sjemenje je klijalo pod *in vitro* uvjetima, osvjetljeno kroz 16 sati kod temperature od 22°C, i pod neosvjetljenim (tama) uvjetima kroz 8 sati kod temperature od 18°C.

Slika 4 pokazuje SDS-PAGE gel prokljalog sjemena. Uzorci su skupljani dnevno, počevši od suhog sjemena. Tvar je homogenizirana u tekućem dušiku i resuspendirana u 50 mM Tris, pH 8,0, u nazočnosti 850 mM NaCl. Nakon centrifugiranja, bistri supernatant je pomiješan s puferom. Uskladišteni proteini i Rubisco podjedinice su označeni u Coomassie obojenom gelu. Nakon tri dana klijanja, količina Rubisco proteina proizvedenog po danu je značajna.

Slika 5 pokazuje northern blot prokljalog sjemena uporabom RNK testova. Uzorci su sakupljeni dnevno, počevši od suhog sjemena. Antisens test sekvenca je sadržavala 197 bp od eksona 3 i 153 bp od 3'-UTR područja rubisco male podjedinice cDNK (netiskano). Proba je generirana od pBluescript plazmida s T7-promotorom korištenjem DIG-UTP u reakciji. Svaki red je napunjen s 3 μ g ukupne RNK. RNK je ekstrahirana korištenjem Qiagen RNeasy Plant Mini Kita. Hibridizacija je načinjena s DIG Easy Hyb puferom bitno prema protokolu proizvođača.

PRIMJER 2

Prpriava novih rbcS-promotora za sustav ekspresije

a. Izolacija novog rbcS-promotora

Rbc cDNK-klonovi su sekvencionirani od četiri dana starih transgenskih supki *Brassica campestris*. Klonovi su podijeljeni u dvije skupine sa sličnim osobinama temeljeno na sekvenci 3'UTR područja.

SDS-page analiza *Brassica campestris* presadnica. Sjemenje *Brassica campestris* je klijalo u serijama od 1 do 7 dana. Pet parova supki je stavljeno u tekući dušik i resuspendirano u puferu za liziranje (50 mM Tris HCl pH 8,5, 2% SDS, 0,1% Bromfenol plavo, 10% glicerola, 2% merkaptetanola (2-ME). Uzorci su kuhani u vodenoj kupelji kroz 10 minuta i analizirani u 15%-tnom SDS-PAGE gelu prema Laemmli (1970). Ekspresija *Rbc* gena je utvrđena da započinje 4 dana nakon namakanja.

b. RNK-pročišćavanje iz supki *Brassica campestris*.

RNK je pročišćena iz 4 dana starih supki uporabom Qiagen RNeasy Kita.

c. cDNK-sinteza je provedena od ukupne RNK supki *Brassica campestris*.

2 µg ukupne RNK i 10 ng *notI*-d(T)₁₈ početnika u 16 µL vode je inkubirano kroz 5 minuta kod temperature od 70°C. Smjesa je premještena na led i dodano je 5 µL od 5 x reakcijskog pufera, 2,5 µL od 5mM dNTP, 20 U inhibitora ribonuklaaze i 200 U od M-MLV reverzne transkriptaze. Reakcijska smjesa je inkubirana kod temperature od 42°C kroz 1 sat.

d. PCR-amplifikacija cDNK klonova ekspresiranih u stanicama supke.

PCR je inicijalno optimaliziran uporabom serije od dvanaest početnika koji su se sastojali od timin nukleotida i promjenljivog dinukleotidnog sidra kao 3'-početnika i 49-mernog oligonukleotida od početnog područja *Brassica napus rbc* gena (Genska banka, pristupni broj g17849) eksona broj III kao 5'-početnika. Inicijalna optimizacija je pokazala da samo GCT₁₁ kao 3'-početnik rezultira u PCR-proizvodu. S ciljem kloniranja ovog PCR-proizvoda, 49-merni oligonukleotid je konstruiran s *NotI*-restriktivnim mjestom. Početnici su izlistani u Tablici 1.

Tablica 1. Početnici korišteni za PCR-izolaciju rubisco cDNK-klonova.

3'početnici za inicijalnu pretragu

- 1: 5'TTTTTTTTTTTTCA3' (BROJ SEKVENCE: 1:)
- 2: 5'TTTTTTTTTTTTCT3' (BROJ SEKVENCE: 2:)
- 3: 5'TTTTTTTTTTTTCC3' (BROJ SEKVENCE: 3:)
- 4: 5'TTTTTTTTTTTTCG3' (BROJ SEKVENCE: 4:)
- 5: 5'TTTTTTTTTTTTGA3' (BROJ SEKVENCE: 5:)
- 6: 5'TTTTTTTTTTTTGT3' (BROJ SEKVENCE: 6:)
- 7: 5'TTTTTTTTTTTTGC3' (BROJ SEKVENCE: 7:)
- 8: 5'TTTTTTTTTTTTGG3' (BROJ SEKVENCE: 8:)
- 9: 5'TTTTTTTTTTTTAA3' (BROJ SEKVENCE: 9:)
- 10: 5'TTTTTTTTTTTTAT3' (BROJ SEKVENCE: 10:)
- 11: 5'TTTTTTTTTTTTAC3' (BROJ SEKVENCE: 11:)
- 12: 5'TTTTTTTTTTTTAG3' (BROJ SEKVENCE: 12:)

5'-početnik (BROJ SEKVENCE: 13:)

5'CGCGGATCCACGGGTTTGTGTACCGTGAGCACGGAAGCACCCCGGAT3'

3'-početnik za kloniranje *rbc* cDNK-klona (BROJ SEKVENCE: 14:)

5'AAGGAAAAAAGCGGCCCAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC3'

Za kloniranje *rbc* cDNK-fragmenta, PCR-amplifikacija je provedena korištenjem 1 µl reakcijske smjese cDNK-sinteze kao predloška, 100 nM 5'-početnika, 100 nM 3'-početnika, 100 µM dNTP i 1,25 U od *Pfu* DNK-polimeraze/25 µL od reakcijske zapremnine. Dobiveni PCR-fragment je kloniran u *NotI* i *Bam*HI-mjesta pUK21-vektora. Sedam pojedinačnih klonova je sekvencionirano. Prema sekvenci, klonovi su podijeljeni u dvije skupine koje sadržavaju 3 slična odnosno 4 slična predstavnika. Jedan predstavnik od obje skupine je odabran za daljnja proučavanja. Sekvence su imenovane *utr2* (BROJ SEKVENCE: 15:) i *utr8* (BROJ SEKVENCE: 16:)

utr2-sekvenca (BROJ SEKVENCE: 15:)

TTCGCGTTGT AAGACATTTC ATAAATAATA TCTACCTCAT
TTCATTTCCTA TTTGTCTGTTT TCTTTGGCTTT TTGTTTCTGA
GGCATGTTAT ATCGGATTGT CAAGTGTCTG ATTTATGAAC

AACATGTAAT CTCTATATGC ATATTTCT

utr8 (BROJ SEKVENCA: 16:)

TTCGCTTTCA TATAATAATA TCTTCCTCAT TTCATTTCCA
 5 ATAAGTCTGT TTCTTTTTTC TCTTTGGATT TCTGTTACGA
 GACTTTCTAT ATCGGATTGT AAAATGTCTG ATTTATGAA
 CATGTAATTT CGG CAAATA

e. Kloniranje *Brassica campestris* rubisco promotora male podjedinice Tip I (65A)

2,8 kb fragment koji nosi promotor i gen koji odgovara UTR 65A (BROJ SEKVENCA: 24:) je amplificiran korištenjem bnr1 (BROJ SEKVENCA: 17:) (5'-GAATTCTAACGACCCTTTTCCG-3') koji je komplementaran *B. napus* rubisco genu male podjedinice kao 5'-početnik i UTR2 (BROJ SEKVENCA: 18:) (5'-GGCCACACTTGACAATCCGATATAA CATGCCTCA-3') koji je specifičan prema UTR 65A (BROJ SEKVENCA: 24:) kao 3'-početnik. Amplifikacija je načinjena s Pfx Platinastom DNK polimerazom (Life Technologies) prema preporukama proizvođača. Regije promotora su amplificirane korištenjem dobivenih fragmenata kao predloška. Bnr3 (BROJ SEKVENCA: 19:) (5'-AAAAAGC TTCTAGACCCTTTTCCGTCATAAGTTTATA-3') koji je komplementaran *B. napus* rubisco genu male podjedinice je korišten kao 5'-početnik i RbSiB (BROJ SEKVENCA: 20:) i RBNCO (BROJ SEKVENCA: 21:) kao 3'-početnik u odjeljenim reakcijama. RbSiB (5'-AGGTCTCCCATGCAGCTAACTCTTCCTCCGTTGCT-3') ima 3' kraj i komplementaran je kraju putativnog ciljajućeg signala peptida kloroplasta *B. napus* rubisco genu male podjedinice i 5'-kraju koja nosi Eco311 mjesto koje nakon rezanja napušta ATG-sadržavajući NcoI mjestu kraj kompatibilan za kloniranje u biljne vektore ekspresije. RBNCO (BROJ SEKVENCA: 21:) (5'-GAGGAAGCCATGGCTACTTCTT-3') je kompatibilan početku područja kodiranja *B. napus* rubisco genu male podjedinice osim dvije nukleotidne promjene koje kreiraju NcoI mjesto oko ATG kodona.

f. Procjena mRNK spremišta za kodiranje male podjedinice ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaze u lišću i presadnicama *Brassica campestris*.

Ukupna RNK je izolirana iz zrelog lišća i četiri dana starih presadnica uporabom RNeasy kita (Qiagen). Glasnička RNK je dalje pročišćena korištenjem Oligo (dT) celulozne kolone prema preporukama proizvođača (New England Biolabs). Oligo T početnik (BROJ SEKVENCA: 22:) (CUACUACUACUAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTVT) i Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptaze (Promega) su korišteni za sintetiziranje ukupnog cDNK spremišta. Rubisco mala podjedinica cDNK je amplificirana upotrebom dva ciklusa PCR (1 min. 94°C, 1 min. 55°C, 1 min. 72°C). PCR početnici; oligo T početnik i početnik koji prepoznaje kraj zadnjeg eksona rubisco male podjedinice (BROJ SEKVENCA: 23:) (CAUCAUCAUTCGACGATCATCGGATTCGACA). PCR proizvod je probavljen s uracil DNK glikozilazom i kloniran u pAMP1 vektor (CloneAMP pAMP System LIFE TECHNOLOGIES). Ukupno je 102 klonova analizirano DNK sekvencijiranjem. 42 klonova su bila od proklijalih presadnica i 60 klonova od zrelog lišća. Tri različite vrste (Tip I, II i III) mRNK su nađene. Sekvence i postotak raspodjele različitih vrsta sekvenci kod proklijalih presadnica i zrelog lišća su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Sekvence i postotak raspodjele različitih vrsta mRNK.

SEKVENCA	Proklijala presadnica	Zreo list
Tip I	29%	26%
Tip II	15%	30%
Tip III	56%	44%

Sekvence tri različite vrste mRNK su kako slijedi.

Tip I (BROJ SEKVENCA: 24:)

TTAATTCGCGTTGTAAGACATTTTCATAAATAATATCTACTCATTTTCATTTCCAT
 TTGTCTGTTTCTTTGGCTTTTGTCTGAGGCATGTTATATCGGATTGTCAAGT
 GTCTGATTTATGAACATGTAATCTCTATATTGCATATTTTCTTCTTGGAACAAAAA
 50 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

Tip II (BROJ SEKVENCA: 25:)

TTAATTTGCTATGACATTCACATAAATAATCTCTGCTCATTTTCATTTCCAATTGT
 CTGTTTCTTTTCCCTTTGGTTTTCTGTTTCTCAGACATTTCTATATCGGATTGTC
 55 AAATGTGTGATTGTGAACATGTAATCTCTATATTGCTTCTTCGTTCTTGGAACAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

Tip III (BROJ SEKVENCE: 26:)

TTAATTCGCTTTTCATATAATAATATCTTCTCATTTCATTTCCTCAATAAGTCTGTTT
 CTTTTTTCTCTTTGGATTCTGTACGAGACTTTCTATATCGGATTGTAAAAT
 GTCTGATTTTATGAACATGTAATTTCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 5 AAAAAAAAAAAAAA

g. Kloniranje najrasprostranjenijeg rubisco gena male podjedinice *Brassica campestris*

Jedan od rubisco gena male podjedinice *B. campestris* predstavlja 56% transkripata prema kvantitativnoj sekvencirajućoj analizi 102 klonirana rubisco UTR-klona male podjedinice. Taj klon je nazvan UTR56 (Tip III, BROJ SEKVENCE: 26:). S ciljem kloniranja odgovarajućeg gena i njegovog uzvodnog područja dizajnirana su četiri početnika da bi se koristili u dvostepenom PCR. U prvom PCR, početnik bnr4 (BROJ SEKVENCE: 27:) (5'-GGCCATGAATTCTAACGACCCCTTTCC GTCATAAAAGT-3') koji je dio rubisco gena male podjedinice *B. napus* (pristupni broj x61097) je korišten kao 5'-početnik. Početnik 56r6 (BROJ SEKVENCE: 28:) (5'-CGCGATATA GAAATTACATGTTTCATAAAATCAGACATTTTAC-3') specifičan za UTR56 (BROJ SEKVENCE: 26:) je korišten kao 3'-početnik. Sastav prvog PCR je bio: 75 mM Tris, pH 8,0 kod 25°C, 20 mM (NH₄)SO₄, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPa, 0,2 µM početnika, 0,025 jedinica/µL *Taq* DNK polimeraze, 0,0016 jedinica/µL *Pfu* DNK polimeraze i 100 pg/µL DNK *B. campestris*. Program je bio: 94°C, 4 minute, 30 X [(94°C, 30 s), (38°C, 30 s), (72°C, 3 min.)]. Očekivani 2,8 kb fragment je pročišćen od agaroznog gela. Zato što nije bilo sigurne informacije o sekvenci, fragment je reamplificiran korištenjem bnr5 (BROJ SEKVENCE: 29:) (5'-GAGGTACCCGCGGCCCGC GAATTCTAACGACCC TTTCCGTCATAAAAG-3') koji ima 3'-kraj komplementaran prema bnr4 (BROJ SEKVENCE: 27:) i proširenje 5'-kraja koji nosi *NotI* 8-baza isječe mjesto i 56r7 (BROJ SEKVENCE: 30:) (5'-GAGAATTCGCGCGCCATAGAAATTACATGTTTCATAAAATC AGACA-3') koji ima 3'-kraj komplementaran na 56r6 (BROJ SEKVENCE: 28:) i proširenje 5'-kraja koje nosi *AscI* 8-baza isječe mjesto. PCR smjesa je bila slična kao kod prvog PCR sa slijedećim izmjenama: 25 pg/µL gel-pročišćenog fragmenta od prvog PCR je korišteno kao predložak i provedeno je samo 7 ciklusa.

Dobiveni proizvod je istaložen, izrezan s *AscI* i *NotI* restriktivnim enzimima i gel-pročišćen. Fragment je kloniran u modificirani pNEB193, pAN (*PmeI* mjesto je promijenjeno u *NotI* mjesto) koje se otvorilo s *AscI* i *NotI*, tretirano s alkalnom fosfatazom iz račića, i nakon inaktivacije enzima grijanjem gel-pročišćeno. Četiri od dobivenih klonova je sekvencionirano s ciljem potvrđivanja da nose UTR56 sekvencu.

Područje promotora je amplificirano uporabom bnr5 (BROJ SEKVENCE: 29:) kao 5'-početnika i 3'-početnika RbSiB (BROJ SEKVENCE: 20:) i RBNCO (BROJ SEKVENCE: 21:) (vidi gore). PCR uvjeti su bili slični onima koji su korišteni za amplifikiranje cijelog gena sa slijedećim izmjenama: 5 ng/µL plazmida DNK koja nosi klonove (linearizirano s *AscI*) je korišteno kao predložak, samo 10 ciklusa je provedeno.

PRIMJER 3.

Usporedba različitih konstitutivnih i inducibilnih promotora za prekomjernu ekspresiju transgena (GUS) kod duhana i *Brassica campestris*

Proklijale presadnice su smrznute s tekućim dušikom i smrvljene. Proteini su ekstrahirani s fosfat-EDTA puferom. Uzorci su centrifugirani i supernatanti su analizirani korištenjem kita za određivanje djelovanja β-glukuronidaze (Sigma). Koncentracija proteina uzoraka je analizirana s proteinskim reagensom (Biorad) korištenjem BSA kao standarda.

Tablica 3. Specifične aktivnosti GUSa s različitim konstitutivnim i inducibilnim promotorima kod duhana i *Brassica campestris*

BILJKA	PROMOTOR	SPECIFIČNA AKTIVNOST (nmoli MU/min/mg topivog proteina)
duhan	<i>B. rubisco</i> Tip I	7
<i>B. campestris</i>	toplotni udar	44
<i>B. campestris</i>	amilaza toplotnog udara	5
<i>B. campestris</i>	35S	28

Kada se slijedila aktivnost promotora kod proklijalog sjemena u seriji od sedam dana detektiran je eksponencijalni porast specifične aktivnosti na primjer kod rubisco promotora. Specifična aktivnost rubisco promotora je bila 0,25 četvrti dan, 0,5 peti dan, 1,6 šesti dan i 7 sedmog dana.

Analiza inhibitora razvoja kloroplasta za rubisco protein i razine mRNK kod prokljalog sjemena

Analiza prokljalih presadnica *B. campestris* je pokazala da rubisco mala podjedinica proteina ima najveću koncentraciju tri dana nakon iniciranja klijanja i rubisco male podjedinice mRNA jedan dan ranije. Pronašli smo da je dodavanjem streptomicina 100 mg/L u medij rasta 48 sati nakon inicijacije klijanja moguće regulirati na dolje sintezu rubisco proteina ali mRNA razina ostaje stalna. S obzirom da je rubisco protein glavni protein kod određenih vrsta prokljalih supki, korisno je regulirati prema dolje njegovu sintezu. Sjemenje je prokljalo u aeriranoj vodi opremljenoj sa streptomycinom. Uzorci su skupljani u razmacima od 12 sati. Razine proteina su analizirane iz SDS-PAGE gela i mRNA razine s RNK dot blot analizom.

PATENTNI ZAHTEVI

1. Postupak temeljen na načelu sakupi-pretvori (source-sink principle) za pretvaranje pričuva proteina, ugljikohidrata i lipida kod sjemena biljaka dvosupnica u pripravak koji obuhvaća jedan ili više željenih genskih proizvoda, **naznačen time**, što rečeni postupak obuhvaća stupnjeve:
 - (a) uzgoj transgenske biljke dvosupnice koja ima sustav ekspresije koji se može inducirati tijekom inicijacije klijanja koja će osigurati unutrašnji izvor uskladištene početne tvari, koji se može sakupiti kao transgensko sjeme dvosupnice;
 - (b) rečeni sustav ekspresije koji obuhvaća regulatorne sekvence koje se mogu inducirati odabrane od regulatornih sekvenci gena koji dekodiraju proteine koji su *de novo* sintetizirani tijekom inicijacije klijanja i nakupljaju se u supkama i endospermi biljke,
 - (c) smještanje zdrobljenog ili nezdobljenog transgenskog sjemena dvosupnica koje obuhvaća jedan ili više ekspresijskih sustava integriranih u biljni genom u dodir s okružujućim medijem i inicirajući klijanje, koje mobilizira unutrašnji izvor početne tvari;
 - (d) iskorištavanje transgenskog sustava ekspresije integriranog u biljnom genomu za *de novo* sintezu jednog ili više željenih genskih proizvoda iz unutrašnjeg izvora početne tvari mobilizirane u stupnju (c);
 - (e) po izboru zaustavljanje klijanja prije nego *de novo* sinteza na novo počne opadati;
 - (f) izoliranje s ili bez načina nizvodnog postupka pripravak koji obuhvaća jedan ili više genskih proizvoda i/ili proizvoda dobivenih biokemijskim reakcijama stupnja (d).
2. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što se pripravak koji obuhvaća najmanje jedan genski proizvod smješta u dodir sa supstratom koji obuhvaća najmanje jedan spoj koji se može transformirati biokemijskim reakcijama kataliziranim s jednim ili više rečenih genskih proizvoda.
3. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što se pripravak koji obuhvaća najmanje jedan genski proizvod smješta u dodir sa reagenskom koji obuhvaća najmanje jedan spoj koji je sposoban modificirati jedan ili više genskih proizvoda.
4. Postupak prema zahtjevima 1-3, **naznačen time**, što izvor početne tvari obuhvaća transgensko sjeme dvosupnice koje je po izboru sterilizirano i klijanje se provodi pod bitno sterilnim uvjetima osiguravajući bitno sterilan sakupi-pretvori sustav proizvodnje.
5. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što sustav ekspresije obuhvaća promotor koji je induciran i/ili može biti induciran tijekom klijanja.
6. Postupak prema zahtjevu 3, **naznačen time**, što promotor bitno miruje ili može biti umiren tijekom uzgoja transgenske biljke u uvjetima polja.
7. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je okružujući medij po izboru puferirana vodena otopina.
8. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je sakupi-pretvori sustav proizvodnje opremljen s najmanje jednim fizikalnim ili kemijskim sredstvom za induciranje klijanja.
9. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je sakupi-pretvori sustav proizvodnje opremljen s najmanje jednim vanjskim izvorom hranjive tvari.
10. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je sakupi-pretvori sustav proizvodnje opremljen s najmanje jednim sredstvom za regulaciju na gore *de novo* sinteze željenog genskog proizvoda.
11. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je sakupi-pretvori sustav proizvodnje opremljen s najmanje jednim sredstvom za regulaciju na dolje *de novo* sinteze genskog produkta koji se normalno proizvodi tijekom klijanja.
12. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time**, što je klijanje po izboru zaustavljeno s najmanje jednim sredstvom koje obuhvaća grijanje, sušenje, drobljenje, odijeljivanje, ekstrakciju, tlačenje i filtriranje i nakon toga izoliranje s ili bez nizvodnog postupka najmanje jednog genskog proizvoda.
13. Pripravak izveden iz sjemena, **naznačen time**, što obuhvaća jedan ili više genskih proizvoda ekspresiranih u supki uključujući presadnicu i/ili uključujući jedan ili više genskih proizvoda izlučenih u okružujuće medije iz supke uključujući presadnicu.
14. Pripravak izveden iz sjemena prema zahtjevu 13, **naznačen time**, što obuhvaća supstrat ili reagens koji obuhvaća najmanje jedan spoj koji se može transformirati s rečenim pripravkom ili koji može modificirati jedan od genskih proizvoda u rečenom pripravku.

15. Pripravak izveden iz sjemena prema bilo kojem od zahtjeva 13-14, **naznačen time**, što je u sušenom obliku ili obliku nizvodnog postupka.
16. Pripravak izveden iz sjemena prema zahtjevu 15, **naznačen time**, što obuhvaća jedan ili više primjenjivih sastojaka za pripravljanje.
- 5 17. Sustav ekspresije koristan u postupku iz zahtjeva 1, **naznačen time**, što obuhvaća jednu ili više regulatorskih sekvenci koje se mogu dobiti iz gena koji dekodiraju proteine koji su *de novo* sintetizirani tijekom inicijacije klijanja i nakupljanja u supkama i endospermu biljke.
18. Način odabira regulatorskih sekvenci korisnih za konstruiranje sustava ekspresije iz zahtjeva 17, **naznačen time**, što obuhvaća stupnjeve
- 10 (a) izolaciju ukupne RNK iz supki i lišća dvosupnica;
- (b) pripravljanje cDNK amplifikacijom rečene RNK s jednim specifičnim biljnim početnikom i početnikom specifičnim za protein koji je *de novo* sintetiziran tijekom inicijacije klijanja i nakupljanja u supkama i endospermi biljke;
- (c) sakupljanje i nanašanje klonova s cDNK;
- 15 (d) upoređivanje rezultata s klonovima dobivenim iz RNK dobivene iz lišća; i
- (e) ponovno dobivanje klonova koji obuhvaćaju cDNK pokazujući povećanu aktivnost kod proklizalog sjemenja dvosupnica.

20 SAŽETAK

Sadašnji izum se odnosi na postupak temeljen na sakupi-pretvori (engl. source-sink) načelu, za proizvodnju zanimljivih proizvoda od izlomljenih (zgnječenih) ili neznječenih proklizalih sjemenki dvosupnica koji obuhvaća sustav ekspresije, koji je induciran ili može biti induciran tijekom klijanja. Produkt je pripravak sjemena koji obuhvaća jedan ili više genskih produkata. Na drugi način je to zanimljiv produkt, dobiven smještanjem pripravka u dodir sa supstratom, koji

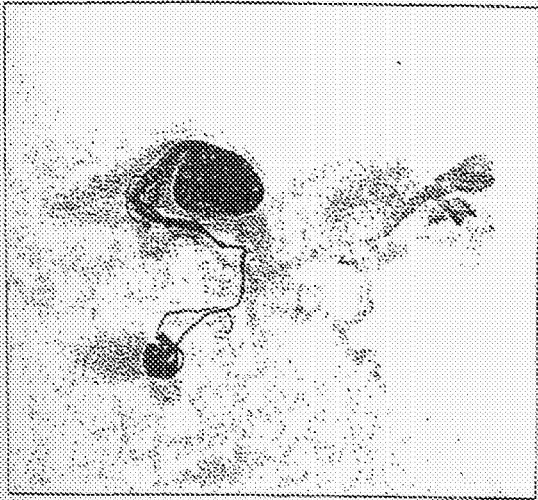
25 sadržava tvar koja se može transformirati sa pripravkom dobivenim iz sjemena kao takvim, sušenim ili u obliku postupka nizvodno.

ALTKA 1

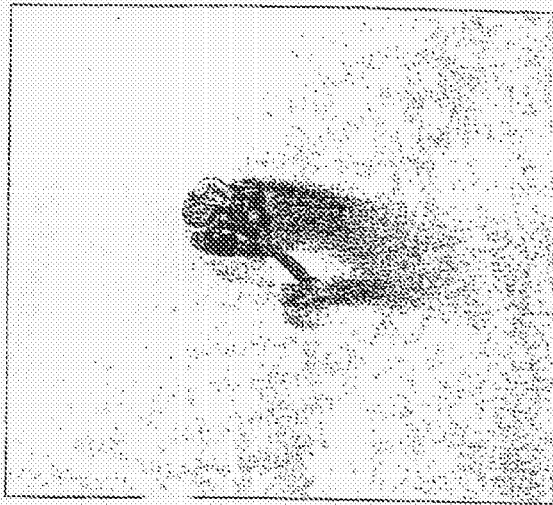
WO 01/41559

PCI/F100/01081

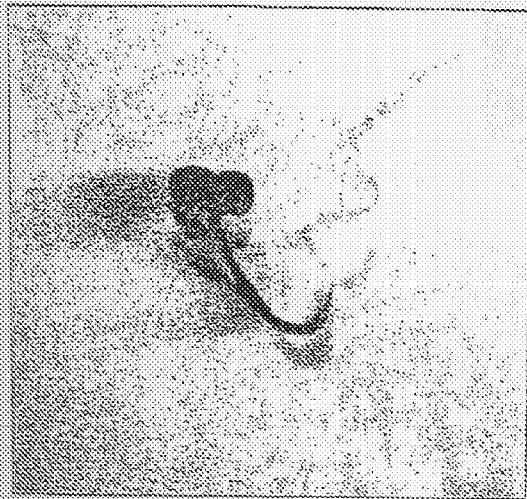
1/5



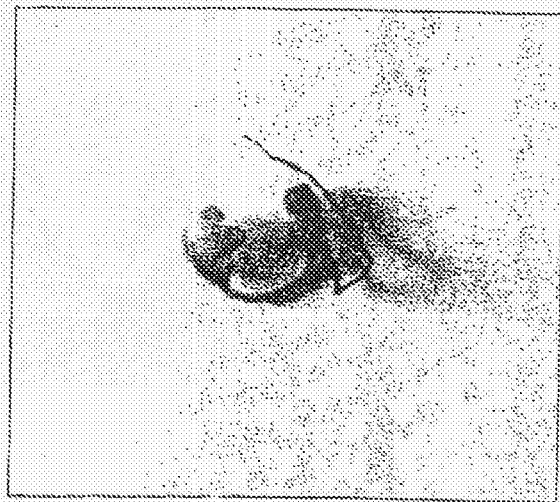
Slika 1A.



Slika 1B.



Slika 1C.



Slika 1D.

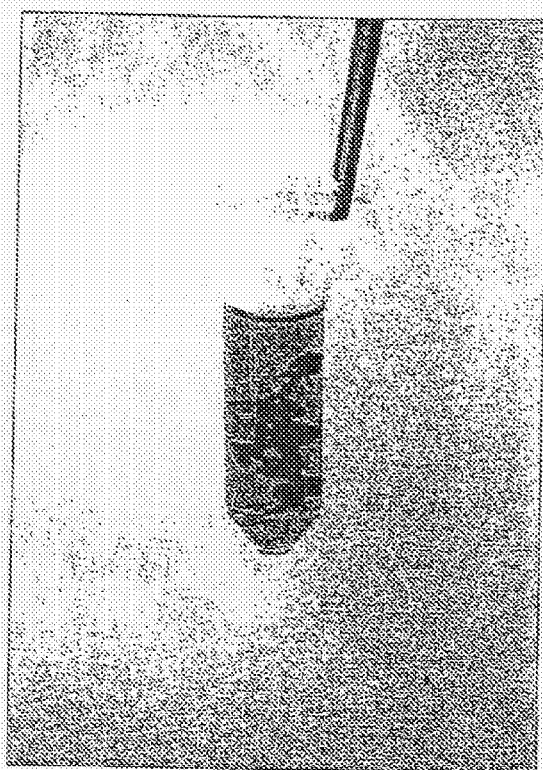
Slika 1.

SLIKA 2.

WO 01/41559

2/5

PCT/FI00/01081



Slika 2.

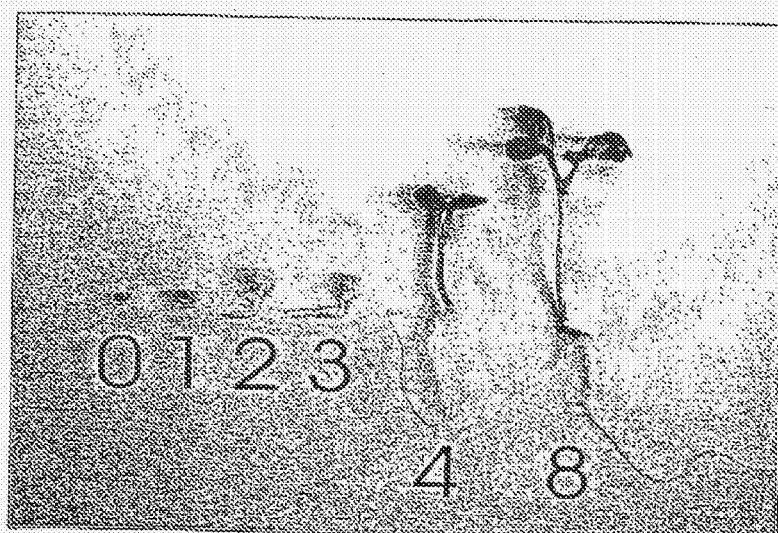
Slika 3

WO 01/41559

3/5

PCT/FI00/01081

Stupanj klijanja sjemena *B. rapa*



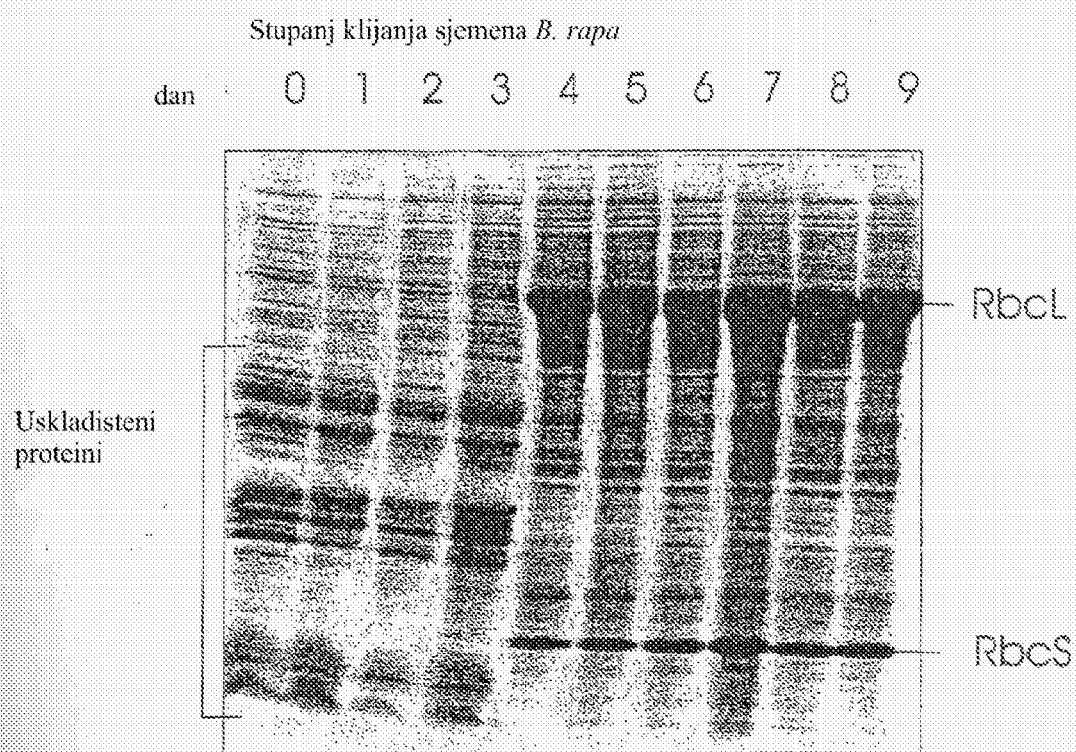
Slika 3.

ALTKA 4

WO 01/41559

PCT/FI00/01081

4/5



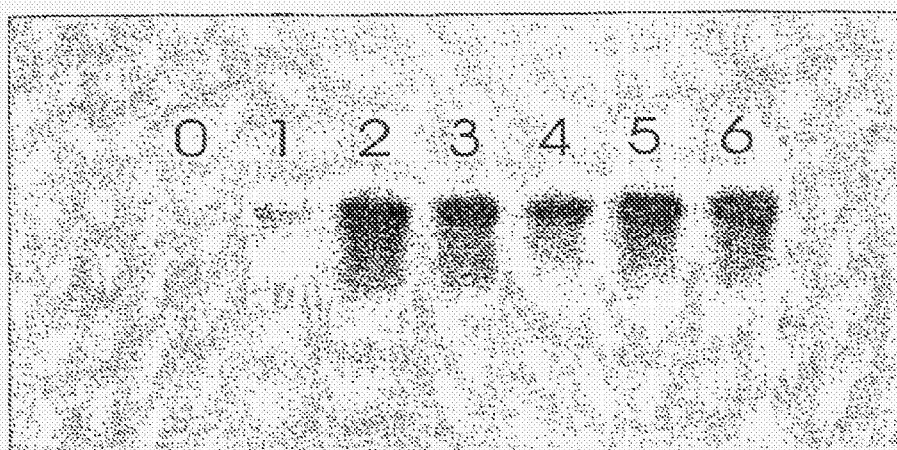
Slika 4.

SLIKA 5

WO 01/41559

5/5

PCT/FI00/01081



Slika 5.

IZLIST SEKVENCI

<110> UniCrop Ltd

5 <120> Postupak za pretvaranje uskladištenih pričuva sjemenja dvosupnica u pripravke koji obuhvaćaju jedan ili više genskih proizvoda

<130> 9HO8PCT

10 <140>
<141>

<150> 19992659
<151> 1999-12-10

15 <160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.1.

20 <210> 1
<211> 13
<212> DNK
<213> Umjetna sekvenca

25 <220>
<223> Opis umjetne sekvence: -

<220>
<223> 3' početnik

30 <400> 1
tttttttt tea 13

<210> 2
35 <211> 13
<212> DNK
<213> Umjetna sekvenca

<220>
40 <223> Opis umjetne sekvence: -

<220>
<223> 3' početnik

45 <400> 2
tttttttt tct 13

<210> 3
<211> 13
50 <212> DNK
<213> Umjetna sekvenca

<220>
<223> Opis umjetne sekvence: -

55 <220>
<223> 3' početnik

<400> 3
60 tttttttt tcc 13

<210> 4

<211> 13
 <212> DNK
 <213> Umjetna sekvenca
 5 <220>
 <223> Opis umjetne sekvence: -
 <220>
 <223> 3' početnik
 10 <400> 4
 tttttttt tcg 13
 <210> 5
 15 <211> 13
 <212> DNK
 <213> Umjetna sekvenca
 <220>
 20 <223> Opis umjetne sekvence: -
 <220>
 <223> 3' početnik
 25 <400> 5
 tttttttt tga 13
 <210> 6
 <211> 13
 30 <212> DNK
 <213> Umjetna sekvenca
 <220>
 <223> Opis umjetne sekvence: -
 35 <220>
 <223> 3' početnik
 <400> 6
 40 tttttttt tgt 13
 <210> 7
 <211> 13
 <212> DNK
 45 <213> Umjetna sekvenca
 <220>
 <223> Opis umjetne sekvence: -
 50 <220>
 <223> 3' početnik
 <400> 7
 55 tttttttt tgc 13
 <210> 8
 <211> 13
 <212> DNK
 <213> Umjetna sekvenca
 60 <220>
 <223> Opis umjetne sekvence: -

	<220>	
	<223> 3' početnik	
5	<400> 8 tttttttt tgg	13
	<210> 9	
	<211> 13	
10	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvenca	
	<220>	
	<223> Opis umjetne sekvence: -	
15	<220>	
	<223> 3' početnik	
	<400> 9 tttttttt taa	13
20	<210> 10	
	<211> 13	
	<212> DNK	
25	<213> Umjetna sekvenca	
	<220>	
	<223> Opis umjetne sekvence: -	
30	<220>	
	<223> 3' početnik	
	<400> 10 tttttttt tat	13
35	<210> 11	
	<211> 13	
	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvenca	
40	<220>	
	<223> Opis umjetne sekvence: -	
	<220>	
45	<223> 3' početnik	
	<400> 11 tttttttt tac	13
50	<210> 12	
	<211> 13	
	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvenca	
55	<220>	
	<223> Opis umjetne sekvence: -	
	<220>	
	<223> 3' početnik	
60	<400> 12 tttttttt tag	13

<210> 13
 <211> 49
 <212> DNK
 5 <213> Umjetna sekvenca

 <220>
 <223> 5' početnik

 10 <220>
 <223> Opis umjetne sekvence: -

 <400> 13
 cgcggatccc acgggtttgt ttaccgtgag cacggaagca cccccggat 49
 15 <210> 14
 <211> 49
 <212> DNK
 <213> Umjetna sekvenca

 20 <220>
 <223> Opis umjetne sekvence: -

 <220>
 <223> 3' početnik za kloniranje rbc cDNK-klona
 25 <400> 14
 aaggaaaaaa gcggccgcaa tttttttt tttttttt ttttttgc 49

 <210> 15
 30 <211> 150
 <212> DNK
 <213> *B. campestris*

 <220>
 35 <223> utr2-sekvenca

 <400> 15
 ttcgcttgt aagacatttc ataaataata tctacctcat ttcattcca ttgtctgtt 60
 tttttggt tttgtttct gaggcattgt atcggattgt gtaagtgtc tgattatga 120
 40 acaacatgta atctctatat gcattttct 150

 <210> 16
 <211> 139
 <212> DNK
 45 <213> *B. campestris*

 <220>
 <223> utr8-sekvenca

 50 <400> 16
 ttcgcttcca tataataata tcttctcat ttcattcca ataagtctgt tttttttc 60
 tcttggatt tctgttacga gactttctat atcggattgt aaaatgtctg attttatgaa 120
 catgtaattt cggcaata 139

 55 <210> 17
 <211> 22
 <212> DNK
 <213> Umjetna sekvenca

 60 <220>
 <223> bnrbl

	<220>	
	<223> opis umjetne sekvence: -	
	<400> 17	
5	gaattctaac gacccttttc cg	22
	<210> 18	
	<211> 34	
	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvence	
10	<220>	
	<223> UTR2	
	<220>	
15	<223> Opis umjetne sekvence: -	
	<400> 18	
	ggccacactt gacaatccga tataacatgc ctca	34
20	<210> 19	
	<211> 38	
	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvence	
25	<220>	
	<223> bnr3	
	<220>	
	<223> opis umjetne sekvence: -	
30	<400> 19	
	aaaaagcttc tagacccttt tccgcataa gttttata	38
	<210> 20	
35	<211> 36	
	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvence	
	<220>	
40	<223> RbSiB	
	<220>	
	<223> opis umjetne sekvence: -	
45	<400> 20	
	caggtctccc atgcagctaa ctcttctctc gttgct	36
	<210> 21	
	<211> 22	
50	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvence	
	<220>	
	<223> RBNCO	
55	<220>	
	<223> opis umjetne sekvence: -	
	<400> 21	
60	gaggaagcca tggctacttc tt	22
	<210> 22	
	<211> 43	

	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvenca	
	<220>	
5	<223> opis umjetne sekvence: -	
	<220>	
	<223> Oligo T početnik	
10	<400> 22	
	cacacacagc ggccgctttt tttttttt tttttttt tvn	43
	<210> 23	
	<211> 30	
15	<212> DNK	
	<213> Umjetna sekvenca	
	<220>	
	<223> opis umjetne sekvence: -	
20	<220>	
	<223> Kraj zadnjeg eksona rubisco male podjedinice	
	<400> 23	
25	cacacacatc gacgatcatc ggattcgaca	30
	<210> 24	
	<211> 180	
	<212> DNK	
30	<213> <i>Brassica campestris</i>	
	<220>	
	<223> Tip I	
35	<400> 24	
	ttaattcgcg ttgtaagaca ttccataaat aatatctact catttcattt ccatttgtct	60
	gttttctttg gctttttgtt tctgaggcat gttatategg attgtcaagt gtctgtatta	120
	tgaacatgta atctctatat tgcataatct ctctctggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
40	<210> 25	
	<211> 180	
	<212> DNK	
	<213> <i>Brassica campestris</i>	
45	<220>	
	<223> Tip II	
	<400> 25	
50	ttaatttgtc atgacattca cataataatc tctgtctatt tcatttccaa ttgtctgttt	60
	ctttccctt tggttttctg ttctcagac attctatc ggattgtcaa atgtgtgatt	120
	gtgaacatgt aatctctata ttgcttcttc gtcttggtaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
	<210> 26	
55	<211> 176	
	<212> DNK	
	<213> <i>Brassica campestris</i>	
	<220>	
60	<223> Tip III	
	<400> 26	

	ttaatcgct tcatataat aatatctct catttcattt ccaataagtc tgtttctttt	60
	ttctctttg gatttctgtt acgagacttt ctatategga ttgtaaatg tctgatttta	120
	tgaacatgta atttctaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	176
5	<210> 27 <211> 38 <212> DNK <213> Umjetna sekvenca	
10	<220> <223> bnr4	
	<220> <223> opis umjetne sekvence: -	
15	<400> 27 ggccatgaat tctaagcacc cttttccgtc ataaaagt	38
20	<210> 28 <211> 42 <212> DNK <213> Umjetna sekvenca	
	<220> <223> opis umjetne sekvence: -	
25	<220> <223> 56r6 <400> 28	
30	cgcgatatag aaattacatg ttcataaaat cagacatttt ac	42
	<210> 29 <211> 48 <212> DNK <213> Umjetna sekvenca	
35	<220> <223> bnr5	
40	<220> <223> Opis umjetne sekvence: -	
	<400> 29 gaggtacccg cggccgcgaa ttctaagcacc cttttccgt cataaaag	48
45	<210> 30 <211> 46 <212> DNK <213> Umjetna sekvenca	
50	<220> <223> 56r7	
	<220> <223> opis umjetne sekvence: -	
55	<400> 30 gagaattcgg cgcgcatag aaattacatg ttcataaaat cagaca	46
60		