

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-597**
(22) Přihlášeno: **18.08.1999**
(30) Právo přednosti: **19.08.1998 US 60/097,150**
(40) Zveřejněno: **15.08.2001**
(Věstník č. 8/2001)
(47) Uděleno: **19.08.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **29.09.2010**
(Věstník č. 39/2010)
(86) PCT číslo: **PCT/US1999/019102**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/011200**

(11) Číslo dokumentu:

302 074

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 5639952.

Lampa G.K. et al.: „Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide“, Mol. Cell Biol. Vol. 5(6), 1370–1378, 1985.

(73) Majitel patentu:

MONSANTO TECHNOLOGY LLC, St. Louis, MO, US

(72) Původce:

Conner Timothy W., Wildwood, MO, US
Santino Colleen G., St. Louis, MO, US

(74) Zástupce:

Ing. František Kania, Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300

(54) Název vynálezu:

**Rostlinné expresní vektory, transformované
rostlinné buňky a způsob pro zlepšení genové
exprese v rostlinách**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje rekombinantní DNA molekuly, které obsahují genové elementy, a mikroorganismy, rostlinné buňky a rostliny transformované DNA molekulami. Dále se týká způsobu pro zlepšení genové exprese v rostlinách.

CZ 302074 B6

Rostlinné expresní vektory, transformované rostlinné buňky a způsob pro zlepšení genové exprese v rostlinách

5 Oblast techniky

Vynález se obecně týká genového inženýrství rostlin. Přesněji se týká zdokonalených systémů genové exprese pro transgenní rostliny s použitím různých kombinací genových elementů v rostlinné expresní kazetě. Vynález se dále týká rekombinantních DNA molekul, které obsahují genové elementy, a mikroorganismů, rostlinných buněk a rostlin transformovaných DNA molekulami. Vynález se dále týká způsobu pro zlepšení genové exprese v rostlinách.

15 Dosavadní stav techniky

Současné postupy genového inženýrství poskytují potřebné nástroje, které umožňují transformovat rostliny tak, aby obsahovaly cizí geny. Konstruktem požadovaného rekombinantního rostlinného genu a jeho zavedením do rostlinných buněk je dnes možné vytvořit transgenní rostliny, které mají jedinečné znaky z hlediska hospodářského významu.

20 V genovém inženýrství rostlin jsou velmi ceněny konzistentní a spolehlivé genové elementy pro použití při konstrukci rekombinantních rostlinných genů. Mnoho takových elementů může zvýšit úroveň genové exprese určitého genu, který je středem zájmu. Přitom mají tyto elementy několik výhod. Za prvé, může být díky optimální kombinaci genových elementů, které poskytnou zvýšené úroveň exprese, dosaženo lépe vyjádřeného fenotypu. To je způsobeno v mnoha příkladech pozorovaným vztahem mezi úrovní transgenní exprese v transgenní rostlině a velikostí změny požadovaného znaku rostliny.

30 Za druhé, nepřekládané genové elementy, které jsou schopny zlepšit expresi, mohou snížit na minimum některé kroky v produkci transgenních rostlin. Čím vyšší jsou dosažené úrovně exprese, tím menší je počet rostlin, které je zapotřebí vyprodukovat a vytržít, aby byly získány ty rostliny, které produkují množství cílového proteinu nebo molekulu RNA postačující k tomu, aby se projevil požadovaný, z hlediska zemědělského výhodný, fenotyp.

35 A konečně, znalost různých alternativ genových elementů poskytuje navíc tu výhodu, že je možno snížit přebytek vektorových elementů. Jsou-li tedy namnožené nezávislé trasgeny zavedeny do transgenních rostlinných linií, použití alternativních expresních vektorových elementů v různých transgenech pomáhá snížit inhibici genové exprese, která souvisí s homologií.

40 Podstata vynálezu

Vynález poskytuje kombinace genových elementů pro použití při konstrukci rekombinantních molekul DNA, které jsou schopny exprese v rostlinách. Rekombinantní molekula DNA obsahující kombinace genových elementů podle vynálezu vykazuje zvýšené úrovně exprese, což je výhodné pro transformaci a regeneraci transgenních rostlin. Zvýšené úrovně exprese dosažitelné pomocí elementů podle vynálezu mají četné výhody, například méně náročný třídící proces, který je nezbytný pro produkci transgenních rostlin a zlepšení fenotypů takto produkovaných rostlin. Elementy jsou kromě toho vhodnými alternativami pro zlepšení možnosti uplatnění genu v transgenních rostlinách, protože minimalizují opakování sekvencí, které bývá spojeno s nestabilitou transgenní exprese.

55 Z jednoho hlediska tedy vynález poskytuje rekombinantní molekulu DNA, která obsahuje funkčně připojené ve směru 5', 3':

- (a) promotorovou sekvencí, která je funkční v rostlinách;
- (b) 5' nepřekládanou vedoucí sekvencí SEQ NO 52 izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro vazebný protein chlorofylu a/b;
- (c) sekvenci intronu, vybranou ze sekvencí SEQ NO 47 až 51, izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z rýžového genu pro aktin, rýžového genu pro sacharózasyntázu, rýžového genu pro fenylalaninamoniumlygázu, rýžového genu pro amylázu a kukuřičného genu pro protein tepelného šoku;
- (d) kódující sekvenci DNA, která je funkční v rostlinách a
- (e) 3' nepřekládanou terminační sekvencí, vybranou ze sekvencí SEQ NO 58 až 63, izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro protein tepelného šoku, pšeničného genu ubichitinu, pšeničného genu pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu, rýžového genu pro glutelin, rýžového genu pro laktátdehydrogenázu a rýžového genu pro beta-tubulin.
- Z dalšího hlediska poskytuje vynález Způsob pro zlepšení genové exprese v rostlinách, přičemž
- (a) rostlinné buňky s rekombinantní molekulou DNA, která obsahuje, funkčně spojené ve směru 5', 3'
- (i) promotorovou sekvencí;
- (ii) 5' nepřekládanou vedoucí sekvencí spojenou s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro vazebný protein chlorofylu a/b a jeho funkčně ekvivalentních variant;
- (iii) kódující sekvenci DNA;
- (iv) sekvenci intronu spojenou s genem vybraným ze skupiny sestávající z rýžového genu pro aktin, rýžového genu pro sacharózasyntázu, rýžového genu pro fenylalaninamoniumlygázu a jejich funkčně ekvivalentních variant a
- (v) 3' nepřekládanou terminační sekvencí spojenou s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro protein tepelného šoku, pšeničného genu ubichitin, pšeničného genu pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu, rýžového genu pro glutelin, rýžového genu pro laktátdehydrogenázu a rýžového genu pro beta-tubulin a jejich funkčně ekvivalentních variant, se transformují;
- (b) rostlinné buňky, které byly transformovány, se vyberou; a
- (c) regenerují se pro získání odlišné rostliny.

Dalším předmětem vynálezu je rostlinná buňka obsahující DNA molekuly podle vynálezu a tkáň, semena a různé rostliny pomocí nich vyprodukované. Další předměty, aspekty a výhody vynálezu budou odborníkům vdané oblasti zřejmé, po seznámení s následujícími popisy, příklady a nároky.

Vynález poskytuje genové elementy pro zlepšení exprese rekombinantních rostlinných genů, které zahrnují nové kombinace intronu a 5' a 3' nepřekládané genové elementy, které jsou zde popsány. DNA sekvence a způsoby podle vynálezu umožňují produkci transgenních rostlin, které mají zvýšené úrovně požadované molekuly RNA nebo molekuly proteinu, který je středem záj-

mu, a to tím způsobem, že usnadní převedení zemědělsky výhodných znaků do rostlin, pomocí genového inženýrství.

5 Pojmy „rekombinantní rostlinný gen“ nebo „rekombinantní molekula DNA“ znamenají v kontextu vynálezu kombinaci genových elementů, které jsou funkčně spojeny tak, aby podle nich mohla probíhat exprese požadované molekuly RNA a/nebo proteinu v rostlinné buňce. DNA molekuly mohou být konstruovány s použitím standardních postupů, dobře známých odborníkům v dané oblasti.

10 Obecně řečeno, rekombinantní rostlinný gen je funkčně uspořádaný od 5' ke 3' konci a obsahuje: (1) oblast promotoru, která je odpovědná za tvorbu molekuly RNA; (2) 5' nepřekládanou sekvenci; (3) kódující sekvenci DNA, která kóduje požadovanou molekulu RNA a/nebo protein a (4) 3' nepřekládanou oblast. Oblast genu nazývaná promotor je odpovědná za řízení transkripce DNA na RNA. Promotory obsahují DNA sekvence, obvykle se nacházející na 5' konci kódující sekvence, které řídí expresi kódující sekvence tak, že kontrolují tvorbu mRNA – poskytují rozpoznávací místo pro RNA polymerázu a/nebo jiné faktory nezbytné pro iniciaci transkripce na správném místě. Promotor použitý v rekombinantním rostlinném genu podle vynálezu je vybrán tak, aby poskytl transkripční aktivitu postačující k dosažení požadovaných úrovní exprese genu nebo genů, které jsou žádány.

20 Je známo mnoho funkčních rostlinných promotorů a mohou být získány z nejrůznějších zdrojů, například z rostlin nebo rostlinných virů a mohou obsahovat, ale nejsou tím omezeny, 35S promotor viru kvěťákové mozaiky (CaMV) (Odell a kol., 1985), 35S promotor viru mozaiky krtičníku (FMV) (Sanger a kol. 1990), promotor tyčinkového viru cukrové třtiny (Bouhida a kol., 25 1993), promotor viru commelina žluté skvrnitosti (Medberry a Olszewski 1993), lehký inducibilní promotor z malé podjednotky ribulóza-1,5-bis-fosfát-karboxylázy (ssRUBISCO) (Coruzzi a kol., 1984), promotor rýžové cytosolik-triosefosfát-izomerázy (TPI) (Xu a kol., 1994), promotor adenin-fosforibosyltransferázy (APRT) *Arabidopsis* (Moffat a kol., 1994), promotor rýžového genu pro aktin 1 (Zhong a kol., 1996) a promotory mannopin syntázy a oktopin syntázy (Ni a kol., 30 1995). Všechny tyto promotory se používají při různých typech konstrukcí rekombinantní DNA, která může být exprimována v rostlinách. Srovnávací analýza konstitutivních promotorů pomocí exprese značkovacích genů, například gen pro uidA (β -glukuronidáza) z *E. coli*, byla provedena s mnoha takovými geny (Li a kol., 1997; Wen a kol., 1993). Jiné vhodné promotory jsou, nejsou však omezeny na promotory, které jsou exprimovány pro tkáň specifickým, tkáň rozšiřujícím nebo vývojově regulovaným způsobem. Příklady těchto typů promotorů jsou také známy odborníkům v dané oblasti.

40 Kromě promotorové sekvence, která řídí expresi funkčně připojených DNA sekvencí, mohou hrát roli ve zlepšení genové exprese další genové elementy. Tyto elementy zahrnují, ale nejsou omezeny na, nepřekládané oblasti a vložené sekvence (introny), které jsou spojeny s geny, ke kterým jsou funkčně připojeny. Slovy „spojeny s“, která zde byla použita, je míněno, že genový element se obvykle nachází ve spojení s genem v průběhu procesování genu, například v průběhu transkripce nebo translace.

45 5' nepřekládaná oblast mRNA může hrát důležitou roli při iniciaci translace a tedy při regulaci genové exprese. 5' nepřekládaná vedoucí sekvence je charakterizována jako ta část mRNA molekuly, která obvykle jde z 5' CAP místa k AUG iniciačnímu kodonu translace proteinu. U většiny eukaryotických mRNA molekul začíná translace vazbou vazebného proteinu CAP na mRNA cap. Pak následuje vazba několika dalších translačních faktorů, stejně jako 43S ribozomového preiniciačního komplexu. Tento komplex postupuje dále po mRNA molekule a hledá AUG iniciační kodon ve vhodném sekvenciálním kontextu. Jakmile jej nalezne, připojí se 60S ribozomální podjednotka a kompletní 80S iniciační komplex iniciuje translaci proteinu (Pain, 1986; Moldave, 1985; Kozak, 1986). Druhá třída molekul mRNA má odlišné rysy iniciace translace. Translace podle těchto molekul mRNA začíná nezávisle na CAP a předpokládá se, že začíná vazbou ribozomu na

interní části 5' konce nepřekládané vedoucí sekvence (Sonenberg, 1990; Carrington a Freed, 1990; Jackson a kol. 1990).

Účinnost iniciace translace může záviset na vlastnostech 5' nepřekládané vedoucí sekvence, takže určení a optimalizace 5' vedoucí sekvence může poskytnout zlepšení úrovní genové exprese v transgenních rostlinách. Například některé studie se zabývaly použitím 5' nepřekládaných vedoucích sekvencí rostlinných virů vzhledem k jejich účinkům na genovou expresi rostlin (Gallie a kol., 1987; Jobling a Gehrke, 1987; Skuzeski a kol., 1990). Zvýšení genové exprese bylo uvedeno při použití vedoucí sekvence viru omega tabákové mozaiky (TMV). Ve srovnání s jinými virovými vedoucími sekvencemi, například vedoucí sekvence viru alfa mozaiky RNA4 (AMV), bylo pozorováno při použití vedoucí sekvence TMV omega dvojnásobné až trojnásobné zlepšení úrovní genové exprese (Gallie a kol., 1987; Skuzeski a kol., 1990). Uvádí se, že také nepřekládané vedoucí sekvence spojené s geny proteinů tepelného šoku významně zvyšují genovou expresi u rostlin (viz například patent US 5 362 865).

Většina sekvencí, které nepodléhají translaci je bohatá na páry A-U a předpokládá se, že tyto sekvence postrádají významnou sekundární strukturu. Jedním z prvních kroků iniciace translace je uvolnění nebo rozvinutí sekundární struktury mRNA (Sonenberg, 1990). Vedoucí sekvence mediátorové RNA se zanedbatelnou sekundární strukturou mRNA nevyžadují tento krok rozvinutí a mohou proto být přístupnější iniciačním komponentám translace. Vedoucí sekvence, které mohou tvořit stabilní sekundární struktury mohou snižovat úroveň genové exprese (Kozak, 1988; Pelletier a Sonenberg, 1985). Schopnost 5' nepřekládané vedoucí sekvence reagovat s translačními komponentami, může hrát klíčovou roli v ovlivnění úrovní následné genové exprese.

5' nepřekládané oblasti podle vynálezu jsou schopny zvýšit úroveň exprese prepisované sekvence, ke které jsou funkčně připojeny. 5' nepřekládané oblasti mohou být spojeny s genem ze zdroje, který je vlastní nebo cizorodý s ohledem na jiné nepřekládané a/nebo překládané elementy přítomné v rekombinantním genu.

Nepřekládané sekvence na 5' konci podle vynálezu jsou izolované sekvence nukleové kyseliny spojené s rostlinnými geny, s výhodou z jednoděložných rostlin, například pšenice a rýže, nejsou však na ně omezeny. Zvláště výhodné jsou 5' nepřekládané oblasti spojené s geny jednoděložných rostlin, které kódují vazebné proteiny chlorofylu a/b. Tyto 5' nepřekládané oblasti jsou ve vynálezu s výhodou zastoupeny 5' nepřekládanou oblastí spojenou s pšeničným genem pro vazebný protein chlorofylu a/b (5' Ta cab vedoucí sekvence) podle SEQ ID NO : 52.

Krátké nekódující sekvence vložené uvnitř genu, které zde nazýváme introny, mohou také zlepšit genovou expresi. Introny mohou zlepšit účinnost tvorby mRNA. V literatuře se uvádí mnoho intronů, které zlepšují genovou expresi, zejména u jednoděložných rostlin. V jednom případě se uvádí, že přítomnost intronu I katalázy (Tanaka 1990), který byl izolován z ricinových bobů, způsobila zvýšení genové exprese u rýže, ale ne u tabáku. Jako značkovací gen byl použit GUS. Ještě další zlepšení bylo dosaženo, zejména u jednoděložných rostlin, konstrukcemi genů, které měly introny v 5' nepřekládané vedoucí sekvenci na pozici mezi promotorem a strukturální kódující sekvencí. Například Callis a kol., (1987) uvádí, že přítomnost intronů pro alkoholdehydrogenázu (Adh-1) nebo intronů Bronze-1 má za následek vyšší úroveň exprese. Mascarenhas a kol., (1990) uvádí dvanásobné zvýšení exprese CAT při použití intronu Adh. Jiné introny vhodné pro použití v molekulách DNA podle vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny na, intron sacharozasynťazy (Vasil a kol., 1989), TMV omega intron (Gallie a kol., 1989) kukuřičný intron hsp 70 uvedený v SEQ ID NO : 47 (patent US 5 593 874 a patent US 5 859 347, které jsou zde zařazeny v dodatcích) a rýžový intron aktinu (McElroy a kol., 1990). Stupeň zvýšení genové exprese může ovlivnit kromě intronů mnoho dalších faktorů, které zahrnují, ale nejsou omezeny na promotor, (Jefferson a kol., 1987), sekvence krajního exonu a umístění nebo lokace intronu vzhledem ke genu (Mascarenhas a kol., 1990).

Krátké nekódující sekvence vložené uvnitř genu podle vynálezu jsou spojeny s rostlinným genem, s výhodou s geny jednoděložných rostlin, které zahrnují pšenici a rýži, ale nejsou na ně omezeny. Zvláště výhodné jsou vložené sekvence spojené s geny jednoděložných rostlin, které kódují proteiny tepelného šoku, aktiny, amylázy, lygázy a syntetázy. Tyto vložené sekvence jsou
 5 zde s výhodou zastoupeny těmito: sekvence kukuřičného genu pro protein tepelného šoku obsahující SEQ ID NO: 47, vložená sekvence z rýžového genu pro aktin obsahující SEQ ID NO: 50, vložená sekvence z rýžového genu pro amylázu obsahující SEQ ID NO: 49, vložená sekvence z rýžového genu pro fenylalaninamoniumlygázu obsahující SEQ ID NO: 48 a vložená sekvence z rýžového genu sacharózasyntázy obsahující SEQ ID NO: 51.

Nepřekládané sekvence nacházející se na 3' konci genu mohou mít také vliv na úroveň exprese. Nepřekládaná oblast 3' konce obsahuje oblast pro vazbu mRNA s terminačním kodonem translace a rozšiřuje se alespoň za polyadenylační místo. Ingelbrecht a kol., (Plant Cell 1: 671 – 80, 1989) hodnotí důležitost těchto elementů a nachází větší rozdíly v expresi ve stabilních rostlinách
 15 v závislosti na zdroji 3' nepřekládané oblasti. Při použití 3' nepřekládaných oblastí spojených se syntázou oktopinu, 2S proteinem semen *Arabidopsis*, malou podjednotkou rbcS z *Arabidopsis*, extenxinem z mrkve a syntézou chalkonu z *Antirrhinum*, byl pozorován šedesátinásobný rozdíl mezi nejlépe exprimujícím konstruktem (která obsahovala 3' nepřekládanou oblast) a konstruktem s nejnižší expresí (která obsahovala 3' oblast syntázy chalkonu). Jako terminační oblast pro expresi genů v rostlinách byla také použita 3' nepřekládaná oblast genu syntázy nopalínu T-DNA z *Agrobacterium tumefaciens* (3' no) obsahující SEQ ID NO: 46. To, že 3' nepřekládané oblasti mohou významně ovlivnit expresi rekombinantních rostlinných genů je dobře známo, ale jejich přesná úloha a způsob, jak je nejlépe určit a optimalizovat pro dosažení maximální exprese,
 20 je zatím oblastí, která není dosud příliš dobře prozkoumanou.

Kódující sekvence rekombinantní molekuly DNA podle vynálezu může kódovat jakoukoli sekvenci nukleové kyseliny, která se přepisuje do RNA, což zahrnuje, ale není omezeno na sekvence kódující vlastní, cizorodé a/nebo modifikované proteiny, které jsou předmětem zájmu. Výběr této sekvence závisí na podmínkách daného použití. Strukturní sekvence DNA obvykle kóduje molekulu proteinu, který je schopen změnit jeden nebo více znaků rostliny. Vhodné strukturní geny
 30 mohou zahrnovat, ale nejsou omezeny na geny pro hubení hmyzu a jiných škůdců, geny pro ochranu proti mikrobiálním a houbovým onemocněním, geny odolnosti vůči herbicidům a geny pro zlepšení kvality rostlin, například vyšší úroda, schopnost přizpůsobení se životnímu prostředí a zvýšení výživné hodnoty. Geny mohou být izolovány z jakéhokoli zdroje, například z rostlin a bakterií, nejsou tím však omezeny.

Kódující sekvence DNA může také působit na fenotypy tak, že kóduje molekulu RNA, která se nepřekládá při translaci, což způsobí cílenou inhibici exprese endogenního genu, například cestou nesmyslného nebo kosupresivního přenosu (viz například Schuch, 1991; Bird, 1991; Jorgensen 1990). RNA by také mohla být katalytická RNA molekula (například ribozym) vytvořená pro štěpení požadovaného endogenního mRNA produktu (viz například Gibson, 1997).

Nepřekládaná oblast na 3' konci zde popisované molekuly DNA obecně způsobuje polyadenylaci 3' konce přepisované mRNA sekvence a terminaci transkripce. Nepřekládaná oblast na 3' konci
 45 může být spojena s genem ze zdroje, který je vlastní nebo cizorodý, s ohledem na jiné nepřekládané a/nebo překládané elementy přítomné v molekule DNA.

3' nepřekládané sekvence podle vynálezu jsou spojeny s rostlinným genem, s výhodou s geny jednoděložných rostlin, které zahrnují, ale nejsou omezeny na pšenici a rýži. Zvláště výhodné jsou 3' nepřekládané sekvence izolované z nukleotidové sekvence spojené s geny jednoděložných rostlin, které kódují pšeničnou fruktóza-1,6-bifosfatázu (Ta fbp 3') obsahující SEQ ID NO: 60, pšeničný protein tepelného šoku (Ta hsp 3') obsahující SEQ ID NO: 58, pšeničný ubichitin (Ta ubiq 3') obsahující SEQ ID NO: 59, rýžový protein glutelin (r glut 3') obsahující SEQ ID NO: 61, rýžovou laktátdehydrogenázu (r lacd 3') obsahující SEQ ID NO: 62 a rýžový beta-tubulin (r btub 3') obsahující SEQ ID NO: 63.
 55

5' a/nebo 3' nepřekládané sekvence a vložené sekvence podle vynálezu mohou být izolovány jedním nebo více z mnoha postupů, které jsou dobře známy odborníkům v dané oblasti nebo mohou být případně vyrobeny synteticky.

V jednom příkladu provedení podle vynálezu je zdrojovým rostlinným materiálem rostlinná RNA izolovaná z rostlinné tkáně. V jiném příkladu provedení podle vynálezu je zdrojovým materiálem syntetická DNA sekvence. Vzorové sekvence pro genetické elementy zahrnují RNA transkripty, cDNA sekvence nebo genomovou DNA. V jiném příkladu provedení podle vynálezu jsou syntetizovány RNA primery pro vytvoření genetických elementů podle vynálezu. PCR primery mohou být syntetizovány tak, aby odpovídaly buď nepřekládané oblasti na 5' konci, nebo nepřekládané oblasti na 3' konci cílových rostlinných transkriptů. Například PCR reakce na prvním řetězci cDNA produktů vytvořených reverzní transkripcí RNA a PCR fragment obsahující požadovanou část nebo úplný genový element mohou být klonovány do expresního vektoru pro testování.

Postupy pro izolaci genů a s nimi spojených genových elementů jsou odborníkům známy a zahrnují například zde uvedené PCR postupy. Různé způsoby množení jsou známy odborníkům a jsou popsány například v patentu US 4 683 195 a 4 683 202 a Innis a kol., 1990. Odborníkům v této oblasti jsou velmi dobře známy publikace, které popisují specifické podmínky a postupy pro konstrukci, manipulaci a izolaci makromolekul (například DNA molekuly, plazmidy atd.), tvorbu rekombinantních organismů a výběr a izolaci genů (viz například Sambrook a kol., 1989; Mailga a kol., 1995; Birren a kol., 1996).

Postupy molekulární genetiky rostlin byly také popsány například v Pouwels a kol., 1985, supp. 1987; Weissbach a Weissbach 1989 a Gelvin a kol., 1990.

Kromě toho je odborníkům v dané oblasti známo, že 5' a/nebo 3' nepřekládané oblasti nebo vložené sekvence podle vynálezu, mohou být upraveny, například přidáním báze, delecí, substitucí atd., přičemž stále poskytují zde uvedené výhody. Takové modifikace jsou v souladu s vynálezem.

Jedna možnost modifikace může například zahrnovat změny v uspořádání nukleotidů ve vedoucí sekvenci, které vedou ke změně sekundární struktury. Vhodná sekundární struktura 5' vedoucí sekvence může být požadována pro optimální expresi. Specifické uspořádání nukleotidů vedoucí sekvence může tedy být tak důležité, jak je důležitá sekundární struktura s ní související. Vedoucí sekvence může proto ve skutečnosti dovolovat takové modifikace v uspořádání nukleotidů, které nezpůsobí změny v sekundární struktuře. Stejně tak mohou být modifikovány introny a 3' nepřekládané sekvence podle vynálezu v souladu se zlepšením genové exprese v jednotlivém systému.

Sekvence sousedící s AUG 5' nepřekládanou oblastí mohou také ovlivnit účinnost translace. V rostlinách byla například určena souhlasná sekvence, která může poskytnout optimální AUG kontext (Joshi a kol., 1987; Koziel a kol., 1996). Tato oblast nepřekládaných sekvencí 5' konce podle vynálezu může tedy být tímto způsobem upravena pro další optimalizaci úrovně transgenové exprese. Kromě toho mohou být modifikace provedeny na dalších částech genu, které zahrnují, ale nejsou omezeny na 3' nepřekládanou oblast nebo vložené sekvence rekombinantní DNA molekuly podle vynálezu, takže nové kombinace elementů v expresním vektoru jsou dále optimalizovány.

Kromě těchto dříve zmíněných elementů může také rekombinantní molekula DNA podle vynálezu obsahovat další regulační elementy, například izolované/cílené sekvence chloroplastů, rozšiřující elementy, atd. (pro přehled o optimalizaci transgenové exprese viz Koziel a kol., 1996). Zlepšení exprese bylo například získáno použitím rozšiřovací sekvence vložené do 5' promotoru.

Rekombinantní molekuly DNA podle vynálezu mohou také obsahovat volitelnou značku. Tyto značky jsou obvykle používány pro výběr transformovaných rostlin nebo rostlinných buněk.

5 které obsahují exogenní genetický materiál, který je předmětem zájmu, to je transgen. Příklady zahrnují, ale nejsou omezeny na neomycin (neo) fosfotransferázový gen (Potrykus a kol., 1985), který poskytuje rezistenci vůči kanamycinu. Buňky exprimující gen pro neomycinfosfotransferázu mohou být vybrány s použitím vhodného antibiotika, například kanamycin nebo G418.
 10 Další značky běžně užívané k selekci zahrnují gen *bar*, který poskytuje rezistenci proti bialafóze, mutantní gen pro syntázu EPSP (Hinchee a kol., 1988), který poskytuje rezistenci vůči glyfosátu; nitrilázový gen, který poskytuje rezistenci vůči bromoxynilu (Stalker a kol., 1988); mutantní gen pro syntázu acetolaktátu (ALS), který poskytuje rezistenci vůči imidazolinonu nebo sulfonylmočovíně (evropská patentová přihláška 154 204 1985); a gen pro rezistenci vůči metotrexátu DHFR (Thillet a kol., 1988).

15 Rekombinantní molekula podle vynálezu může také obsahovat rozlišovací značku, která slouží k označení genové exprese, jenž má být vyhodnocena. Běžně používané rozlišovací značky obsahují gen pro β -glukuronidázu nebo uidA (GUS) kódující enzym, pro který jsou známé různé chromogenní substráty (Jefferson a kol., 1987); gen pro luciferázu, (Ow a kol., 1986), R-lokus gen, jehož produkt reguluje tvorbu barviv anthokianů (červená barva) v rostlinných tkáních (Dellaporta 1988) a gen pro β -laktamázu (Sutcliffe a kol., 1978), který kóduje enzym, pro který jsou známy různé chromogenní substráty (například PADAC, chromogenní cefalosporin); xzIE gen (Zukowsky a kol., 1983), který kóduje katechol dioxygenázu, která může měnit chromogenní katecholy; gen pro α -amylázu (Ikata a kol., 1990); gen pro tyrozinázu (Katz a kol., 1983), který kóduje enzym oxidující tyrozin na DOPA a dopachinon, který se zpětně kondenzuje na melanin; gen pro α -galaktozidázu, který kóduje enzym, jehož substrát je chromogenní α -galaktóza; atd.

25 Označení „volitelný“ a „rozlišovací“ mohou být také použity ve spojení s geny, které kódují „zapisovatele“ značky, jejichž přítomnost může být zjištěna jako prostředek k určení nebo výběru transformované buňky. Příklady zahrnují značky, které kódují utajené antigeny, které mohou být určeny pomocí interakce s protilátkami nebo dokonce utajené enzymy, které mohou být zjištěny katalyticky. Utajené proteiny spadají do mnoha tříd, včetně malých, difúzibilních proteinů, které jsou zjistitelné například pomocí testu ELISA, malých aktivních enzymů zjistitelných v extracelulárním roztoku (například α -amyláza, β -laktamáza, fosfotricintransferáza) nebo proteinů, které jsou vloženy nebo odchyceny buněčnou stěnou (jako například proteiny, které obsahují vedoucí sekvenci jako je například ta, nalezená v expresní jednotce extensin nebo tabáku PR-S). Další možné volitelné/rozlišovací/zapisovatelné značkovací geny jsou dobře známé odborníkům v dané oblasti.

35 Jednotlivé nukleotidové sekvence 5' a 3' nepřekládaných elementů zařazené v přihlášce jsou samozřejmě reprezentativní ukázkou v tom smyslu, že podle nich mohou být získány a/nebo vytvořeny ekvivalentní sekvence nebo jejich části. Ekvivalentní znamená, že geny nebo jejich části mají stejnou funkci jako elementy nebo jejich části, které jsou zde popsány a poskytují stejnou výhodu nebo jednotlivý znak rostliny v podstatě stejným způsobem.

40 Mnoho různých postupů a metod klonování je dostupných v obchodní síti a byly podrobně popsány (viz například Sambrook a kol., 1989; Birren a kol., 1996). Tyto postupy jsou velmi dobře známy a odborníci v dané oblasti je mohou využít ke konstrukci molekul DNA podle vynálezu.

45 Jakýkoli typ vektoru může být použit podle vynálezu, příkladem je expresní vektor plazmidu *E. coli*, vynález se však na něj neomezuje. Kombinace genových elementů podle vynálezu jsou s výhodou funkčně spojeny s rostlinným transformačním vektorem. Při konstrukci rekombinantní molekuly DNA podle vynálezu jsou obvykle, s použitím metod známých odborníkům v dané oblasti, vloženy odlišné její složky nebo fragmenty do vhodného vektoru pro klonování, který je schopen replikace v bakteriálním hostiteli, například *E. coli*.

55 Vynález také zahrnuje bakteriální buňky nebo viriony obsahující molekuly DNA s nepřekládanými sekvencemi podle vynálezu. Vložení takových vektorů do hostitele může být provedeno s použitím metod, které jsou odborníkům známy. Molekula DNA podle vynálezu může být vlo-

žena do genomu rostliny kteroukoli z pěti vhodných metod. Vhodné metody transformace rostlin zahrnují transformaci spojenou s *Agrobacterium*, použití lipozomů, elektroporaci, chemické úpravy, které zvyšují vstoupání volné DNA, dodání volné DNA pomocí ostřelování mikroprojektily, transformaci s použitím virů nebo pylu, atd.

Metody pro transformaci dvouděložných rostlin upřednostňují použití *Agrobacterium tumefaciens*. Příklady transgenních rostlin mohou být bavlna (patent US 5 004 863; patent US 5 159 135; patent US 5 518 908, WO 97/43430) a sója (patent US 5 569 834; patent US 5 416 011), nejsou však na ně omezeny.

Mnoho transformačních a regeneračních metod je dostupných pro jednoděložné rostliny, například pro kukuřici, (Songstad a kol., 1995; Klein a kol., 1988), rýži (Toriyama a kol., 1986) a pšenici (Cheng a kol., 1997; a patent US 5 631 152 zde zařazený v dodatcích), výčet však není tímto omezen. Odborníkům je zřejmé, že může být použito mnoho transformačních a regeneračních metodologií a upraveno pro tvorbu stálých transgenních rostlin z jakéhokoli množství cílové plodiny, která je předmětem zájmu. Také metody transformace a regenerace rostlin jsou odborníkům velmi dobře známy (například viz Hinchee a kol., (1994) a Ritchie & Hodges (1993).

Byly provedeny zkoušky genové exprese založené na přechodné expresi klonovaných konstruktů nukleové kyseliny pomocí vložení molekul nukleové kyseliny do rostlinných buněk, čehož bylo dosaženo buď reakcí s glykolem, elektroporací, nebo ostřelováním částicemi (Marcotte a kol., (1988); Marcotte a kol., (1989); McCarty a kol., (1991); Hattori a kol., (1992); Goff a kol., (1990). Přechodné expresní systémy mohou být použity pro rychlé testování úrovní genové exprese a funkční analýzu genových konstruktů (viz zejména Mailga a kol., (1995)).

Vynález se také týká rostlinných buněk, jejichž genom obsahuje jednu nebo více rekombinantních molekul DNA, které obsahují 5' a/nebo 3' zde uvedené nepřekládané sekvence. Různé rostliny, obsahující takové buňky, budou mít znaky či výhody získané expresí kódující sekvence DNA, která je funkčně připojena k uvedeným sekvencím. Tyto rostliny mohou být jednoděložné nebo dvouděložné a mohou zahrnovat, ale nejsou omezeny na rostliny patřící k čeledím vybraným z následujících: vojtěška, jablono, *Arabidopsis*, ječmen, brukev, brokolice, zelí, citrus, kukuřice, bavlník, len, česnek, locika, oves, olejnaté semeno, řepka, cibule, kanola, okrasné rostliny, hrách, podzemnice olejná, paprika, lilek brambor, rýže, žito, čirok, jahody, sója, slunečnice, cukrová třtina, cukrová řepa, rajče, tabák, pšenice, topol, borovice, jedle, eukalypt, čočka, grep, banán, čaj, okrasné trávy. Zvláště výhodné rostliny jsou vojtěška, ječmen, kukuřice, bavlna, kanola, lilek brambor, rýže, žito, sója, slunečnice, cukrová řepa a pšenice. Nejvýhodnější rostliny jsou jednoděložné, například kukuřice, pšenice a rýže.

Pro přesné pochopení obsahu vynálezu jsou přiloženy následující příklady, které jsou uvedeny pouze pro ilustraci a nemají omezovat podstatu vynálezu. Jedná se o příklady určitých výhodných příkladů provedení podle vynálezu. Postupy popsané v následujících příkladech jsou považovány za dobře fungující pro potřeby vynálezu, mohou tedy být považovány za nejvýhodnější pro jeho praktické provedení. V popsaných specifických příkladech provedení vynálezu je však možno provést mnoho změn, přičemž může být dosaženo podobného nebo stejného výsledku aniž by došlo k odchýlení od podstaty vynálezu.

Kromě postupů zde speciálně zmíněných je vynález v souladu se známými publikacemi, které popisují podmínky a postupy pro konstrukci, manipulaci a izolaci makromolekul (například DNA molekul, plazmidů, atd.) pro výrobu rekombinantních organismů a pro třídění a izolování klonů, (viz například Sambrook a kol., (1989); Mailga a kol., (1995); Birren a kol., (1996).

Přehled obrázků

5 Následující obrázky jsou součástí stávajícího popisu vynálezu a jsou zde zařazeny pro další ukázkou určitých hledisek vynálezu. Vynález může být lépe chápán po prostudování jednoho nebo více těchto obrázků a podrobného popisu konkrétních příkladů provedení podle vynálezu, které jsou zde uvedeny.

- Obr. 1 ukazuje plazmid pMON19469
- 10 Obr. 2 ukazuje plazmid pMON26052
- Obr. 3 ukazuje plazmid pMON26055
- Obr. 4 ukazuje plazmid pMON26054
- Obr. 5 ukazuje plazmid pMON19433
- Obr. 6 ukazuje plazmid pMON32502
- 15 Obr. 7 ukazuje plazmid pMON32506
- Obr. 8 ukazuje plazmid pMON32509
- Obr. 9 ukazuje plazmid pMON32510
- Obr. 10 ukazuje plazmid pMON32513
- Obr. 11 ukazuje plazmid pMON 19437
- 20 Obr. 12 ukazuje plazmid pMON32515
- Obr. 13 ukazuje plazmid pMON3 2516
- Obr. 14 ukazuje plazmid pMON32517
- Obr. 15 ukazuje plazmid pMON33216
- Obr. 16 ukazuje plazmid pMON33210
- 25 Obr. 17 ukazuje plazmid pMON33220
- Obr. 18 ukazuje plazmid pMON3 3219
- Obr. 19 ukazuje plazmid pMON47901
- Obr. 20 ukazuje plazmid pMON47906
- Obr. 21 ukazuje plazmid pMON47907
- 30 Obr. 22 ukazuje plazmid pMON47915
- Obr. 23 ukazuje plazmid pMON47916
- Obr. 24 ukazuje plazmid pMON47917
- Obr. 25 ukazuje plazmid pMON47919
- Obr. 26 ukazuje plazmid pMON32648
- 35 Obr. 27 ukazuje plazmid pMON 18364
- Obr. 28 ukazuje plazmid pMON 19568

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad I

Konstrukty expresních vektorů obsahujících kombinace genových elementů pro zlepšení transgenní exprese.

10 Konstrukty expresních vektorů obsahující kazety genových elementů, které zahrnují pšeničné nebo rýžové elementy, byla provedena pomocí teplotní hybridizace syntetických oligonukleotidů nebo PCR izolací z pšeničné listové mRNA nebo rýžové genomové DNA a spojením (ligací) do restrikčních míst proti směru a po směru exprese genu v tomto pořadí, GUS značkovacího genu. Plazmidy použité pro klonování a konstrukci různých expresních kazet jsou uvedeny v tabulce 1.

15 Všechny testované konstrukty měly e35S promotor, který je promotorem pro 35S RNA z CaMV obsahující duplikaci -90 -ti až 300 oblastí. Další elementy obsažené v plazmidech zahrnují následující: počátky replikace (ori-M13 a ori-V), značkovací geny, například GUS nebo LUC, které jsou kódujícími sekvencemi pro betaglukuronidázu a luciferázu, v tomto pořadí, a kódující sekvence pro selekci antibiotik (AMP bakteriální selekce) a KAN (propůjčující rezistenci vůči neomycinu a kanamycinu aminoglykosidových antibiotik). Plazmid pMON32648 (obr. 26) obsahuje protiplísňový protein z kostřavy, (Tfe AFP), jak bylo popsáno v přihlášce vynálezu 60/097150. Další obvyklé transformační vektory mohou být obsaženy v, ale nejsou omezeny na, pMON18364 (obr. 27), což je dvojnásobný *Agrobacterium* transformační vektor a MON19568 (obr. 28), což je plazmid linearizovaný před použitím transformační metody ostřelování částicemi.

25 Při použití PCR byly dodrženy podmínky doporučené výrobcem, (viz například Strategene, La Jolla, CA, PE Biosystems, Foster City, CA). Plazmid DNA byl izolován a přečištěn s použitím přístrojů a chemikálií běžně dostupných v obchodní síti. (viz například Qiagen, Valencia, CA). Syntetická DNA byla zakoupena od Midland Certified Reagent Co., Midland, TX).

30

Tabulka 1: Konstrukty vektorů *

Konstrukty (plazmid)	(5' vedoucí s./intron /značkovací s./3' terminační s.)	klonovaná místa (genový element)
PMON19469*	žádná / hsp70 I / GUS / nos 3' (obr. 1)	BgIII, NcoI (hsp70 I)
PMON26043	žádná / GUS/ nos 3'	BgIII, NcoI, XbaI
PMON26052*	Ta hsp L / hsp70 I / GUS/ nos 3'	BgIII, NcoI (hsp70 I)

	(obr. 2)	
PMON25454	vektor rýžového intronu	StuI / NcoI (ractII)
PMON26044	Ta cab L / ractII / GUS / nos 3'	NcoI / Stu (ractII), EcoRI/Sma (nos 3')
PMON26055*	Ta hsp L / ractII / GUS / nos 3' (obr. 3)	Stu I / NcoI (ractII)
pMON26045	Ta fbp L / GUS / nos 3'	HindIII, Xba, BgIII, NcoI
pMON25456	žádný / ractII / GUS / nos 3'	HindIII / BcII (e35S/ractII)
pMON26064	ractII / Ta fbp L / GUS / nos 3'***	HindIII, Xba, BcII
pMON26054*	Ta cab L / ractII / GUS / nos 3'	StuI / NcoI (ractII), viz obr. 4
		EcoRI / SmaI (nos 3')
pMON26038	Ta cab L / GUS / nos 3'	XbaI, BgIII, NcoI, PstI, (Pst / BgIII, nos 3')
pMON19433*	žádný / hsp70 I / GUS / nos 3'	EcoRI / Bam HI (nos 3') BgIII / EcoRI, viz obr. 5
pMON18375	žádný / hsp70 I / GUS / Ta hsp 17 3'	EcoRI / SmaI (Ta hspI 73')
pMON32502*	Ta cab L / ractII / GUS / Ta hsp 17 3'	viz obr. 6
pMON32506*	Ta hspL / ractII / GUS / Ta hsp 17 3'	viz obr. 7
pMON18377	žádný / hsp70 I / GUS / Ta ubiq 3'	EcoRI / Sma I (Ta ubiq 3')
pMON32509*	Ta fbp L / ractII / GUS / Ta ubiq 3'	viz Obr. 8
pMON32510*	Ta hsp L / ractII / GUS / Ta ubiq 3'	viz Obr. 9
pMON18379	žádný / hsp70 I / GUS / Ta fbp 3'	
pMON32513*	Ta fbp L / ractII / GUS / Ta fbp 3'	viz obr. 10
pMON19437*	žádný / hsp70 I / LUX / nos 3'	NcoI / EcoRI (LUX) viz obr. 11

pMON32515*	Ta cab L / ractII / LUX / Ta hsp 3'	NcoI / EcoRI (LUX)
		viz obr. 12
pMON32516*	Ta fbp L / ractII / LUX / Ta ubiq 3'	NcoI / EcoRI (LUX)
		viz obr. 13
pMON32517*	Ta fbp L / ractII / LUX / Ta fbp 3'	NcoI / EcoRI (LUX)
		viz obr. 14
pMON32518*	Ta fbp L / ractII / LUX / r lac d 3'	viz obr. 15
pMON33210*	žádný / hsp70 I / GUS / nos	PmlI, BgIII, XbaI (r btubL)
		viz obr. 16
pMON33220*	r btub L / hsp70 I / GUS / nos 3'	viz obr. 17
pMON26046	Ta per L / žádný / GUS / nos	BgIII/NcoI (Ta per L)
		PstI/BgIII
pMON33211	žádný / r amy I / GUS / nos 3'	BgIII / XbaI (r amy I)
pMON33226	žádný / r pal I / GUS / nos 3'	BgIII / Xba (r pal I)
pMON33228	žádný / r ssl I / GUS / nos 3'	BgIII / Xba (r ssl I)
pMON33225	Ta cab L / ractII / GUS / r glut 3'	EcoRI / Sph (r glut 3')
pMON33200	žádný / hsp70 I / GUS / nos 3'	BgIII I PmlI
pMON33219*	r amy L / hsp70 I / GUS / nos	viz obr. 18
pMON47901*	Ta cab L / hsp70 I / GUS / r glut 3'	viz obr. 19
pMON47906*	Ta hsp L / ractII / GUS I r lac d 3'	viz obr. 20
pMON47907*	Ta hsp L / ractII / GUS / r glut 3'	viz obr. 21
pMON47915*	Ta per L / ractII / GUS / r lac d 3'	viz obr. 22
pMON47916*	Ta per L / ractII / GUS / r glut 3'	viz obr. 23
pMON47917*	Ta per L / ractII / GUS / r btub 3'	viz obr. 24
pMON47919*		viz obr. 25
pMON47909	Ta hsp L / ractII / GUS / r lac d 3'	BgIII/NcoI
pMON33216	Ta cab L / ractII / GUS / r btub 3'	StuI / NcoI
pMON47910	Ta hsp L / ractII / GUS / r glut 3'	NcoI / BgIII (hsp70 I)
pMON47918	Ta per L / hsp70 I / GUS / r lac d 3'	NcoI / BgIII (hsp70 I)
pMON47920	Ta per L / hsp70 I / GUS / r btub	BgIII / NcoI (hsp70 I)

* obr.

** * odlišná orientace: Intron/vedoucí sekvence/značkovací sekvence/3'

Vložená sekvence z kukuřičného proteinu tepelného šoku (hsp70 intron), která byla popsána v patentech US 5 593 874 a 5 859 347, které jsou zde zařazeny v dodatcích, je uvedena v SEQ ID č.: 47. Základní syntetická vedoucí sekvence je uvedena v SEQ ID č.: 45. 5' nepřekládaná vedoucí sekvence z pšeničné mRNA pro zamýšlenou nízkou molekulární hmotnost proteinu tepelného šoku (5' Ta hsp 17 L) (Genebank Accession Č. XI3431.gb_pl) (SEQ ID č.: 53) byla vytvořena pomocí teplotní hybridizace SEQ ID č.: 5, SEQ. ID č.: 6, SEQ ID č.: 7 a SEQ ID č.: 8. 5' konec výsledného fragmentu má BamHI kohezní konec, za nímž následuje XbaI restriční místo a 3' konec má BglII místo, za nímž následuje NcoI kohezní konec pro subklonování. Tento fragment byl spojen s 5 676 kb BglII a NcoI fragmentem pMON 19469 (obr. 1), čímž vznikl pMON26043.

Plazmid pMON26052 (obr. 2) byl vytvořen subklonováním 884 pb BglII a NcoI fragmentu z pMON19469 (obr. 1) do BglII a NcoI míst pMON26043. Plazmid pMON26043 obsahuje jak HP70 intron tak 5' pšeničnou vedoucí sekvenci (Ta hsp vedoucí sekvence).

Plazmid pMON26055 (obr. 3) byl vytvořen subklonováním 0,449 kb StuI a NcoI fragmentu obsahujícího rýžový aktinový intron (raci 1 intron) (SEQ ID č.: 50) (McElroy a kol., 1991) z pMON25454 do BglII a NcoI míst pMON26043 s použitím adaptérů na StuI místo, které tvoří s BglII komplementární konec (SEQ ID č.: 3 a SEQ ID č.: 4).

5' nepřekládaná vedoucí sekvence z pšeničné mRNA pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu (5' Ta fbp L) (Genebank Accession č. X07780.gb_pl) (SEQ ID č.: 54) byla vytvořena teplotní hybridizací SEQ ID č.: 9, SEQ ID č.: 10, SEQ ID č.: 11 a SEQ ID č.: 12. 5' konec výsledného fragmentu má BamHI kohezní konec, za nímž následuje XbaI restriční místo a 3' konec má BglII místo, za nímž následuje NcoI kohezní konec pro subklonování. Tento fragment byl spojen s 5676 kb BglII a NcoI fragmentem pMON19469 (obr. 1), čímž vznikl konstrukt pMON26045.

Plazmid pMON26064 byl vytvořen subklonováním 1 095 kb HindIII a BclI fragmentu obsahujícího rýžový aktinový intron (McElroy. a kol., 1991) a e35S promotoru (Kay a kol., 1987) z pMON25456 do HindIII a XbaI míst pMON26045 s použitím adaptérů na BclI místo, které tvoří s XbaI komplementární konec (SEQ ID č. 13 a SEQ ID č. 14).

Plazmid pMON26054 (obr. 4) byl vytvořen subklonováním 0,449 kb StuI a NcoI fragmentu obsahujícího rýžový aktinový intron (McElroy. a kol., 1991) z pMON25454 do BglII a NcoI míst pMON26045 s použitím adaptérů na StuI místo, které tvoří s BglII komplementární konec (SEQ ID č. 3 a SEQ ID č. 4).

5' nepřekládaná vedoucí sekvence vazebného proteinu chlorofylu a/b (5' Ta cab L) (Genebank Accession č. M10144.gb_pl) (SEQ ID č.:52) byla izolována reverzní transkripcí z pšeničné listové RNA a poté podrobena 40 cyklům PCR, denaturační teplota 94 °C po dobu 1 minuty, teplota hybridizace 50 °C po dobu 2 minut a teplota důkladného zahřátí 72 °C po dobu 3 minut. Použité primery SEQ ID č.: 1 a SEQ ID č.: 2 tvoří BamHI a XbaI restriční místa na 5' konci a BglII a NcoI tvoří restriční místa na 3' konci pro subklonování. Fragment 77 párů bází obsahující 5' nepřekládanou vedoucí sekvenci vazebného proteinu chlorofylu a/b byl pak štěpen pomocí BamHI a NcoI a spojen s 5 676 kb BglII a NcoI fragmentem pMON19469 (obr. 1), čímž vznikl konstrukt pMON26038.

Plazmid pMON26044 byl vytvořen subklonováním 0,449 kb StuI a NcoI fragmentu obsahujícího rýžový aktinový intron (McElroy a kol., 1991) z pMON25454 do BglII a NcoI místa pMON26038 s použitím adaptérů na StuI místo, které tvoří s BglII komplementární konec (SEQ ID č.: 3 a SEQ ID č.: 4).

3' nepřekládané oblasti obsahující terminační sekvenci a polyadenylační sekvence byly izolovány a klonovány do pMON19433. Plazmid pMON19433 je odvozen z pUC 119 a navíc obsahuje

CAMV rozšířený 35S promotor, hsp70 intron, GUS značkovací gen a nopalín syntetázu (nos) 3' nepřekládané sekvence (SEQ ID č.: 46). Tento vektor obsahuje EcoRI místo a BamHI místo sousedící s nos 3' terminační sekvencí umožňující návrat a substituci alternativních 3' terminačních sekvencí. Syntéza cDNA byla provedena s použitím oligo dT primem v PCR reakčním pufru s MgCl₂, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP a TTP. Pět mikrogramů kompletní RNA z buňky pšeničného listu bylo vloženo do reakčního pufru PCR, při objemu 20 bl. Reakce byla zahájena přidáním 4 jednotek reverzní transkriptázy (Gibco BRL; Gaithersburg, MD) a inkubována při teplotě 42 °C po dobu 2 hodin. Zahřívání reakce bylo ukončeno a reakce byla ochlazena na -20 °C.

Dva mikrolitry této reakční směsi byly přidány do každého PCR reakčního pufru s obsahem dNTP, jak bylo popsáno dříve, ve 100 mikrolitech obsahujících 0,5 jednotky Taq polymerázy podle návodu výrobce (Boehringer Mannheim Biochemicals; Indianapolis, IN). Reakce byla přelita 50 mikrolitry minerálního oleje a cyklována v termocyklovači při teplotě 94 °C po dobu 1 minuty, při teplotě 45 °C po dobu 2 minut a při teplotě 72 °C po dobu 2 minut opakovaně 40 cyklů. 3' nepřekládaná oblast z pšeničného ubichitinového genu (3' Ta ubiq) (SEQ ID č.: 59) byla namnožena z cDNA produktů s primerovými sekvencemi SEQ ID č.: 15 a SEQ ID č.: 16. 3' nepřekládaná oblast z pšeničného genu tepelného šoku (3' Ta hsp 17) (SEQ ID č.: 58) byla namnožena, jak bylo uvedeno dříve, s použitím primem sekvencí SEQ ID č.: 17 a SEQ ID č.: 18. 3' nepřekládaná oblast z bisfosfatázy fruktózy (3' Ta fbp) (SEQ ID č.: 60) byla namnožena, jak bylo uvedeno dříve, s použitím primem sekvencí SEQ ID č.: 19 a SEQ ID č.: 20.

Produkty amplifikace byly podrobeny elektroforéze na agarózovém gelu a analyzovány na velikost. Fragmenty PCR odpovídající 3' Ta ubiq (-225 pb), 3' Ta hsp (-240 pb) a 3' ta fbp (-130 pb) byly štěpeny s EcoRI a BamHI, gel byl přečištěn na 1% agarózovém gelu a izolován s použitím Qiagen PCR podle návodu výrobce (Qiagen, Santa Clarita, CA). Nakonec byly štěpené PCR fragmenty klonovány do 6,5 kb fragmentu z EcoRI BamHI štěpeného základního vektoru pMON 19433 (obr. 5). Výsledné transformanty s vloženými sekvencemi z 3' nepřekládaných oblastí pšeničných genů (Ta fbp, Ta hsp a Ta ubiq) byly ověřeny pomocí DNA sekvenování.

Expresní vektor pMON32502 (obr. 6) byl konstruován pomocí štěpení pMON26044 a pMON18375 s EcoRI a SmaI. 0,24 kb Ta hsp 3' fragment z pMON18375 byl spojen s 6,0 kb vektorem hlavního fragmentu pMON26044, čímž vznikl konstrukt pMON32502. Produkty ligace byly transformovány do DH5 alfa buněk *E. coli* pomocí standardních postupů, umístěny na LB agarové desky s obsahem vybraných úrovní ampicilinu (100 µg/ml).

Expresní vektor pMON32506 (obr. 7) byl konstruován pomocí štěpení pMON26055 (obr. 3) a pMON18375 s EcoRI a SmaI. 0,24 kb Ta hsp 3' fragment z pMON18375 byl spojen s 5,9 kb vektorem fragmentu pMON26055 (obr. 3), čímž vznikl konstrukt pMON32506. Produkty ligace byly transformovány do DH5 alfa buněk *E. coli* pomocí standardních postupů.

Expresní vektor pMON32509 (obr. 8) byl konstruován pomocí štěpení pMON26054 a pMON18377 s EcoRI a SmaI. 0,23 kb Ta ubiq 3' fragment z pMON18377 byl spojen s 5,9 kb vektorem fragmentu pMON26054 (obr. 4), čímž vznikl konstrukt pMON32509. Produkty ligace byly transformovány do DH5 alfa buněk *E. coli* pomocí standardních postupů.

Plazmid pMON32510 (obr. 9) byl konstruován pomocí štěpení pMON26055 (obr. 3) a pMON18377 s EcoRI a SmaI. 0,23 kb Ta ubiq 3' fragment z pMON18377 byl spojen s 5,9 kb vektorem fragmentu pMON26055, čímž vznikl konstrukt pMON32510 (obr. 9). Produkty ligace byly transformovány do DH5 alfa buněk *E. coli* pomocí standardních postupů.

Plazmid pMON32513 (obr. 10) byl konstruován pomocí digesce pMON26054 a pMON18379 s NcoI a SmaI. 2,0 kb GUS/Ta fbp 3' sekvence fragment z pMON18379 byl spojen s 4,1 kb vektorem fragmentu pMON26054, čímž vznikl konstrukt pMON32513. Produkty ligace byly transformovány do DH5 alfa buněk *E. coli* pomocí standardních postupů.

Plazmidy pMON32515 (obr. 12), pMON32516 (obr. 13) a pMON32517 (obr. 14) byly konstruovány pomocí štěpení pMON32502, pMON32509 a pMON32513 s NcoI a EcoRI. V každém případě byl pak přibližně 4,3 kb fragment spojen s 1,8 kb luciferázovým NcoI fragmentem, který
 5 byl vytvořen částečným štěpením s EcoRI z pMON 19437 (obr. 11). Produkty těchto ligací byly transformovány do DH5 alfa buněk *E. coli* pomocí standardních postupů.

5' nepřekládaná vedoucí sekvence z rýžového beta-tubulinu (5' r btub L) (Genebank Accession č. L19598.gb_pl) (SEQ ID č.: 56) byla vytvořena kinázováním (reakce užívající T4 polynukleotidkinázu pro přidání 5' fosfátů pro následující ligační kroky) a teplotní hybridizací (vaření následované pomalým ochlazováním) SEQ ID č.: 21, SEQ ID č.: 22. SEQ ID č.: 23 a SEQ ID č.: 24. 5' konec výsledného fragmentu má PmII otevřený konec a 3' konec má BglIII kohezní konec pro subklonování. Tento fragment byl spojen s 6,507 kb PmII a BglIII fragment pMON33210 (obr. 16), čímž vznikl konstrukt pMON3 3 220 (obr. 17).

5' nepřekládaná vedoucí sekvence z genu pšeničné peroxidázy (5' Ta per L) (Genebank Accession č. X56011.gb_pl) (SEQ ID č.: 55) byla vytvořena působením kinázy a teplotní hybridizací SEQ ID č.: 25, SEQ ID č.: 26, SEQ ID č. 27 a SEQ ID č.: 28. 5' konec výsledného fragmentu má BglIII kohezní konec, za nímž následuje XbaI restriční místo a 3' konec má BglIII místo, za nímž
 20 následuje NcoI kohezní konec pro subklonování. Fragment byl spojen s 5 676 kb BglIII a NcoI 10 fragmentem pMON19469 (obr. 1), čímž vznikl konstrukt pMON26046.

5' nepřekládaná vedoucí sekvence z rýžového amylázového genu (Genebank Accession č. M24287.gb_pl (5' r amy L) (SEQ ID č.: 57) byla vytvořena teplotní hybridizací SEQ ID č.: 41. SEQ ID č.: 42., SEQ ID č.: 43 a SEQ ID č.: 44 a fosforylována a připojena do linearizovaného plazmidu pMON33200 štěpeného pomocí PmII a BglIII, čímž vznikl konstrukt pMON33219.

První intron rýžového amylázového genu (r amyl intron) (Genebank Accession č. X16509.gb_pl) (SEQ ID č.: 49) společně s 10 páry bází sekvence sousedních 5' a 3' exonů byl izolován pomocí PCR rýžové (*Oryza sativa*) genomové DNA s použitím asi 1 µg DNA. Amplifikace byla prováděna s použitím primerových sekvencí SEQ ID č.: 29 a SEQ ID č.: 30. DNA byla denaturována po dobu 1 minuty při teplotě 95 °C, podrobena teplotní hybridizaci po dobu 1 minuty při teplotě 50 °C a prodloužena po dobu 3 minut při teplotě 72 °C, celkem 30 cyklů. Výsledný produkt PCR byl štěpen pomocí BglIII a XbaI a spojen s 5 687 kb BglIII a XbaI fragmentem pMON33210 (obr. 16), čímž vznikl konstrukt pMON33211.

Rýžový fenylalininamoniumlygázový intron (r pal intron) (Zhu a kol., 1995) spolu s 10 páry bází 5' a 3' sousedních exonových sekvencí (SEQ ID č.: 48) byl izolován pomocí PCR rýžové genomové DNA. Amplifikace byla provedena s použitím primerových sekvencí SEQ ID č.: 31 a SEQ ID č.: 32. DNA byla denaturována po dobu 1 minuty při teplotě 95 °C, podrobena teplotní hybridizaci po dobu 2 minut při teplotě 50 °C a prodloužena po dobu 3 minut při teplotě 72 °C, celkově 30 cyklů. Výsledný produkt PCR byl štěpen s BglIII a XbaI a spojen s 5 687 kb BglIII a XbaI fragmentem pMON33210 (obr. 16), čímž vznikl konstrukt pMON33226.

První intron rýžového sacharóza syntetázového genu (r ssl intron) (Wang a kol., 1992) spolu s 10 páry bází 5' a 3' sousedních exonových sekvencí (SEQ ID č.: 51) byl izolován pomocí PCR z rýžové genomové DNA. Amplifikace byla provedena s použitím primerových sekvencí SEQ ID č.: 33 a SEQ ID č.: 34. DNA byla denaturována po dobu 1 minuty při teplotě 95 °C, podrobena teplotní hybridizaci po dobu 2 minut při teplotě 50 °C a prodloužena po dobu 3 minut při teplotě 72 °C, celkově 30 cyklů. Výsledný produkt PCR byl štěpen pomocí BglIII a XbaI a spojen s 5687 kb BglIII a XbaI fragmentem pMON33210 (obr. 16), čímž vznikl konstrukt pMON33228.

3' nepřekládaná terminační sekvence z rýžového glutelinu typu II (3' r glut) (Genebank Accession č. X05664.gb_pl) (SEQ ID č.: 61) byla izolována pomocí PCR rýžové genomové DNA. Amplifikace byla provedena s použitím primerových sekvencí SEQ ID č.: 35 a SEQ ID č.: 36. DNA byla
 55

denaturována po dobu 1 minuty při teplotě 95 °C, podrobena teplotní hybridizaci po dobu 2 minut při teplotě 50 °C a prodloužena po dobu 3 minut při teplotě 72 °C, celkem 30 cyklů. Výsledný produkt PCR byl štěpen s SphI a EcoRI. pMON33225 obsahuje klonovanou SphI/EcoRI r glut 3' nepřekládanou terminační oblast.

5

3' nepřekládaná terminační sekvence z rýžové laktátdehydrogenázy (3' r lacd) (Genebank Accession č. D 13817.gb_pl) (SEQ ID č.: 62) byla izolována pomocí PCR rýžové genomové DNA. Amplifikace byla provedena s použitím primerových sekvencí SEQ ID č.: 37 a SEQ ID č.: 38. DNA byla denaturována po dobu 1 minuty při teplotě 95 °C, podrobena teplotní hybridizaci po dobu 2 minut při teplotě 40 °C a prodloužena po dobu 3 minut při teplotě 72 °C, celkem 30 cyklů. Výsledný produkt PCR byl štěpen pomocí SphI a EcoRI. pMON33218 (obr. 15) obsahuje vložený SphI / EcoRI fragment.

10

3' nepřekládaná terminační sekvence z rýžového beta-tubulinu (3' r btub) (Genebank Accession č. L19598.gb_pl) (SEQ ID č.: 63) byla izolována pomocí PCR rýžové genomové DNA. Amplifikace byla provedena s použitím primerových sekvencí SEQ ID č.: 39 a SEQ ID č.: 40. DNA byla denaturována po dobu 1 minuty při teplotě 95 °C, podrobena teplotní hybridizaci po dobu 2 minut při teplotě 40 °C a prodloužena po dobu 3 minut při teplotě 72 °C, celkem 30 cyklů. Výsledný produkt PCR byl štěpen pomocí SphI a EcoRI. pMON33216 (obr. 13) obsahuje vložený SphI / EcoRI fragment.

15

20

Konstrukt pMON47901 (obr. 19) byl vytvořen spojením 3166 kb EcoRI a PstI fragmentu pMON33225, 0,71 kb PstI a BglII fragmentu pMON26038 a 2,671 kb BglII a EcoRI fragmentu pMON19433.

25

Konstrukt pMON47906 (obr. 20) byla vytvořena spojením 5748 kb NcoI a BglII fragmentu pMON47909 a 0,449 kb StuI and NcoI fragmentu pMON33216 s použitím adaptérů na StuI místo, které tvoří s BglII komplementární konec (SEQ ID č.: 3 a SEQ ID č.: 4).

30

Konstrukt pMON47907 (obr. 21) byl vytvořen spojením 5743 kb NcoI a BglII fragmentu pMON47910 a 0,449 kb StuI a NcoI fragmentu pMON33216 s použitím adaptérů na StuI místo, které tvoří BglII komplementární konec (SEQ ID č.: 3 a SEQ ID č.: 4).

35

Konstrukt pMON47915 (obr. 22) byl vytvořen spojením 5758 kb NcoI a BglII fragmentu pMON47918 a 0,449 kb StuI a NcoI fragmentu pMON33216 s použitím adaptérů na StuI místo, které tvoří BglII komplementární konec (SEQ ID č.: 3 a SEQ ID č.: 4).

40

Konstrukt pMON47916 (obr. 23) byl vytvořen spojením 5753 kb NcoI a BglII fragmentu pMON47919 (obr. 26) a 0,449 kb StuI a NcoI fragmentu pMON33216 s použitím adaptérů na StuI místo, které tvoří BglII komplementární konec (SEQ ID č.: 3 a SEQ ID č.: 4).

45

Konstrukt pMON47917 (obr. 24) byl vytvořen spojením 5895 kb NcoI a BglII fragmentu pMON47920 a 0,449 kb StuI a NcoI fragmentu pMON33216 s použitím adaptérů na StuI místo, které tvoří BglII komplementární konec (SEQ ID č.: 3 a SEQ ID č.: 4).

50

Konstrukt pMON47919 (obr. 25) byl vytvořen spojením 3166 kb EcoRI a PstI fragmentu pMON33225, 0,726 kb PstI a BglII fragmentu pMON26046 a 2,671 kb BglII a EcoRI fragmentu pMON19433 (obr. 5).

55

Všechny konstrukty plazmidů byly ověřeny pomocí restriční štěpení pomocí BglII a testovány v přechodné expresní zkoušce v protoplastech získaných z kalusu pšenice Mustang nebo v protoplastech získaných z kalusu kukuřice BMS nebo byly testovány jako stabilní integrované konstrukty v transgenních rostlinách, jak je popsáno dále.

Příklad 2

Přechodné transformace a značená genová exprese v pšenici a kukuřici

5 Přečištěná plazmidová DNA byla připravena Qiagen maxi postupem podle návodu výrobce (Qiagen, Valencia, CA). GUS plazmidy obsahující 5' nepřekládané vedoucí sekvence nebo 3' nepřekládané terminační oblasti a kombinace 5' a 3' nepřekládaných oblastí ve vektorových DNA a pMON19437 jako vnitřní kontrolu luciferázy byly smíchány a podrobeny elektroporaci. Pro reverzní pokusy, které zkoumaly namnožení s přidávanými kódujícími sekvencemi, byla lucife-
10 ráza proměnným značkovacím genem, GUS v pMON19469 byl vnitřní kontrolou. Transformace byly provedeny dvojmo. Elementy 3' nepřekládané oblasti v kombinaci s 5' nepřekládanými vedoucími sekvencemi byly také testovány vůči kontrolnímu základnímu vektoru pMON19469.

15 Analýza exprese genů v rostlinách byla publikována (Schledzewski a kol., 1994; Steinbiss a kol., 1991; Stefanov a kol., 1991). Analýza exprese protoplastů, například ta zde popsaná, často určuje průběh exprese rekombinantního genu v rostlinných buňkách.

Analýza genové exprese v pšeničném protoplastu.

20 Postup použitý pro izolaci a přípravě pšeničných protoplastů byl proveden tak, jak uvádí Zhou a kol., 1993. Použitý elektroporační pufr byl již dříve popsán (Li a kol., 1995). Použitá kultivační média byla MS1 WSM (4,4 g Gibco MS sol/l, 1,25 ml Thiamin HCL (0,4mg/ml), 1 ml 2,4-D (1 mg/ml), 20 g/L sacharózy, 0,15 ml asparaginu (15 mg/ml), 0,75 g MgCl₂. 109 g.L 0,6 M mannitol, pH 5,5.

25 Suspenze Mustang byly použity k izolaci protoplastů asi čtyři dny po subkultivaci. 8 g suspenze pšeničných buněk bylo vlito do kultivační zkumavky a buňky se nechaly usadit. Médium bylo odstraněno a zbylé buňky resuspendovány s 40 ml roztoku enzymů, přeneseny na petriho misku, překryty fólií a inkubovány při teplotě 26 °C po dobu 2 hodin na rotoru při 40 ot/min. Suspenze
30 byla centrifugována při 200 g po dobu 8 min, dvakrát promyta s centrifugací mezi promýváním, resuspendována v 10 ml promývacího roztoku a uložena na ledu. Bylo určeno množství protoplastů a objem upraven na konečnou koncentraci 4 x 10⁶ protoplastů/ml. Asi 0,75 ml protoplastů bylo přidáno do každé elektroporační kyvety a asi 50 µg plazmidové DNA v 50 µl roztoku bylo přidáno k protoplastům. Podmínky elektroporace byly 960 µFaradů a 160 voltů s použitím Bio-
35 Rad Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Vzorky zůstaly na ledu po dobu 10 minut před elektroporací a v průběhu elektroporace. Po elektroporaci byly vzorky ponechány na ledu po dobu asi 10 minut a pak odstraněny z ledu. Ohřály se na pokojovou teplotu asi na dobu 10 minut. Buňky, které prošly elektroporací byly poté pipetovány do MS1 WSM média a inkubovány ve tmě po dobu 18 až 22 hodin při teplotě 24 °C. Buňky byly vytěženy centrifugací
40 při teplotě 200 až 250 g po dobu 8 minut a zmrazeny na suchém ledu pro následnou analýzu na geny, které byly předmětem zájmu.

Analýza genové exprese v kukuřičném protoplastu

45 Pro vyhodnocení GUS/LUX exprese různých konstruktů byl použit přechodný testovací systém pro kukuřičné protoplasty. Izolace a elektroporace kukuřičných listových protoplastů byla provedena podle popisu v Sheen. 1991 s těmito změnami: semena byla povrchově sterilizována, naklíčena v 1/2MS médiu (2,2 g/l MS soli, 0,25% gelrite) a pěstována 5 dní při teplotě 26 °C při foteriodě den/noc – 16 hod/18 hod, 6 dní v naprosté tmě, 26 °C a 24 hodin v nejprve uvede-
50 ných podmínkách. Druhý pravý list z každé rostlinky byl podélně rozřezán na tenké plátky a štěpen po dobu asi 2 hodin na světle při teplotě 26 °C. Po štěpení byly misky protočeny při 80 až 100 ot/min po dobu 20 až 30 sekund a protoplasty/enzymy roztok pipeován přes filtr 190 µm. Protoplasty byly sečteny s použitím hemacytometru. Bio-Rad Gene modulační kyvety (Bio-Rad, Hercules, CA) s 0,4 cm gap a maximálním objemem 0,8 ml byly použity pro elektro-
55 porace. Do kyvety bylo přidáno 10 až 100 µg plazmidové DNA, aby bylo dosaženo 5 µg DNA

obsahující luciferázový gen jako vnitřní kontrolu. Konečná hustota protoplastů byla asi 3 miliony na ml až 4,5 milionu na ml při podmínkách elektroporace 125 μ Faradů kapacitance a 200 voltů. Protoplasty byly inkubovány na ledu po resuspendaci v elektroporačním pufru a ponechány na ledu 10 minut po elektroporaci. Protoplasty byly přidány do asi 7 ml MS média upraveného, jak uvádí Fromm a kol., 1987, s přidavkem 0,6 M manitolu v petriho miskách se stejným médiem plus 1,5 % SeqPlaque agarózy (FMC Bioproducts, Rockland, ME). Protoplasty byly vytěženy centrifugací 24 hodin po elektroporaci a použity pro následující expresní analýzu na gen(y), které byly předmětem zájmu.

10 Aktivita GUS

Aktivita GUS (β -glukuronidáza) byla určena z 25 μ l buněčného extraktu podle metod, které uvádí Jefferson a kol., (1987) s použitím 2 mM MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid) v dříve popsaném extrakčním pufru. Fluorescence byla měřena s použitím Hoescht DNA Fluorometrem (Model TKO 100). Methylumbelliferon (Sigma) standardní křivka byla vytvořena s použitím a 1 μ M roztoku.

Aktivita luciferázy

20 Pro určení aktivity luciferázy bylo od každého testovaného surového extraktu proteinu umístěno na mikrotitrovou desku deset mikrolitrů. Dvacet pět mikrolitrů 2X pufru (50 mM tricinu (pH 7,8), 30 mM $MgCl_2$, 10 mM ATP a 0,5 mg/mL) bylo přidáno do každého extraktu. Reakce byly zahájeny přidáním 25 μ l 10 mM luciferinu. Vzorky byly míchány a hodnota chemoluminiscence každého vzorku byla určena podle Packard TopoCount microplate scintilačního čítače s použitím 25 5 minutové sčítací prodlevy a sčítacího času 0,2 minuty.

Výsledky jsou vyjádřeny jako poměr úrovně testovaného značkovacího genu k úrovni vnitřního kontrolního značkovacího genu. Kontrolní plazmid obsahoval jiný značkovací gen a byl použit pro korekci variability v transformačních a extrakčních postupech.

30 Tabulka 2

Účinek 5' nepřekládaných vedoucích sekvencí na expresi GUS v protoplastech pšenice Mustang

Vektor	5' nepřekládaná vedoucí sekvence	intron	3' nepřekládaná terminační sekvence	Poměr GUS/LUX exprese
pMON19469	základní-synt.	hsp 70	nos	1,0
pMON25456	základní-synt.	rýžový aktin	nos	0,9
pMON26052	Ta hsp	hsp 70	nos	1,8
pMON26055	Ta hsp	rýžový aktin	nos	4,0
pMON26064	Ta fbp	rýžový aktin	nos	4,2
pMON26044	Ta cab	rýžový aktin	nos	6,7

40 Účinek 5' nepřekládané vedoucí sekvence na expresi GUS v protoplastech pšenice Mustang byl měřen s použitím konstruktů, které obsahovaly různé 5' nepřekládané vedoucí sekvence. Úroveň exprese pro kontrolní plazmid obsahující základní syntetickou 5' sekvenci (SEQ ID č.: 45), hsp70 intron (SEQ ID č.: 47) a 3' nos terminační oblast (SEQ ID č.: 46) byla stanovena jako 1,0. Exprese GUS v pšeničných protoplastech byla zvýšená při použití 5' nepřekládaných vedoucích

sekvencí pšeničného proteinu tepelného šoku (Ta hsp), pšeničné fruktóza-1,6-bisfosfatázy (Ta fbp) nebo pšeničného vazebného proteinu chlorofylu a/b (Ta cab) ve srovnání se základními syntetickými sekvencemi (tabulka 2). Méně průkazný byl účinek u protoplastů kukuřice BMS (tabulka 3).

5

Tabulka 3

Účinek 5' nepřekládaných vedoucích sekvencí na expresi GUS v protoplastech kukuřice BMS

10

vektor	5' nepřekládaná vedoucí sekvence	Intron	3' nepřekládaná terminační sekvence	Poměr GUS/LUX exprese
pMON19469	základní-synt.	hsp 70	nos	1,0
pMON26052	Ta hsp	hsp 70	nos	0,8
pMON26055	Ta hsp	rýžový aktin	nos	4,9
pMON26064	Ta fbp	rýžový aktin	nos	0,7
pMON26044	Ta cab	rýžový aktin	nos	ND

ND – nedetekováno

Tabulka 4 uvádí výsledky GUS v protoplastech pšenice Mustang s použitím konstruktů, které obsahují 3' nepřekládané sekvence z pšeničného proteinu tepelného šoku (3' Ta hsp), pšeničné fruktóza-1,6-bisfosfatázy (3' Ta fbp) nebo pšeničného ubichitinu (3' Ta ubiq) ve srovnání s vektorem, který obsahuje nos 3' oblast. Každá z 3' nepřekládaných oblastí vykazuje zvýšenou expresi GUS v poměru k expresi pozorované s nos 3' nepřekládanou oblastí.

20

Tabulka 4

Účinek 3' nepřekládaných terminačních oblastí na expresi GUS v ostřelovaných pšeničných listech

25

vektor	vedoucí sekvence	intron	3' terminační oblast	poměr exprese GUS/LUX
pMON19433	základní-synt.	hsp 70	nos	1,0
pMON18379	základní-synt.	hsp 70	Ta fbp	1,9
pMON 18375	základní-synt.	hsp 70	Ta hsp	2,8
pMON 18377	základní-synt.	hsp 70	Ta ubiq	2,6

Kombinované účinky popsaných 5' a 3' nepřekládaných sekvencí byly vyhodnoceny v protoplastech pšenice Mustang. Expese LUX byla měřena před expresí GUS, aby se potvrdilo, že zvýšené úrovně exprese nebyly specifické pro GUS. Úrovně exprese GUS a exprese LUX byly zvýšené při použití konstruktů obsahujících Ta cab, Ta hsp nebo Ta fbp 5' nepřekládané vedoucí sekvence a Ta ubiq, Ta fbp nebo Ta hsp 3' nepřekládané terminační sekvence (tabulka 5).

35

Tabulka 5

Kombinované účinky 5' a 3' nepřekládaných terminačních sekvencí na expresi GUS a LUX v protoplastech pšenice Mustang

5

vektor	vedoucí sekvence	intron	3' terminační sekvence	Poměr GUS/LUX exprese	Poměr LUX/GUS exprese
pMON19469	základní-synt.	kukuřičný hsp 70	nos	1,0	--
pMON32502	Ta cab	rýžový aktin	Ta hsp	11,9	--
pMON32506	Ta hsp	rýžový aktin	Ta hsp	1,6	--
pMON32509	Ta fbp	rýžový aktin	Ta ubiq	8,5	--
pMON32510	Ta hsp	rýžový aktin	Ta ubiq	3,5	--
pMON32513	Ta fbp	rýžový aktin	Ta fbp	12,5	--
pMON19437	základní-synt.	kukuřičný hsp 70	nos	--	1,0
pMON32516	Ta fbp	rýžový aktin	Ta ubiq	--	6,2
pMON32517	Ta fbp	rýžový aktin	Ta fbp	--	6,2
pMON32515	Ta cab	rýžový aktin	Ta hsp	--	7,6

Kombinované účinky popsaných 5' nepřekládaných vedoucích sekvencí a 3' nepřekládaných terminačních sekvencí byly také měřeny v protoplastech kukuřice BMS. Expese GUS byla obecně zvýšená oproti základní kontrole (tabulka 6). Výsledky pozorované u kukuřice potvrdily výsledky získané u pšenice a ukazují, že výhodné účinky 5' a 3' nepřekládaných sekvencí podle výnězu nejsou omezeny druhem, ze kterého nepřekládané sekvence pocházejí.

15 Tabulka 6

Kombinované účinky 5' a 3' nepřekládaných terminačních sekvencí na expresi GUS v protoplastech kukuřice BMS.

20

Vektor	vedoucí sekvence	intron	3' terminační sekvence	poměr GUS/LUX exprese
PMON19469	základní-syntetická	hsp 70	nos	1,0
PMON32502	Ta cab	rýžový aktin	Ta hsp	5,0
PMON32506	Ta hsp	rýžový aktin	Ta hsp	5,8
PMON32509	Ta fbp	rýžový aktin	Ta ubiq	0,9
PMON32510	Ta hsp	rýžový aktin	Ta ubiq	2,5
PMON32513	Ta fbp	rýžový aktin	Ta fbp	1,2

Příklad 3

Stabilní transformace v rostlinách typu pšenice

5

Účinky 5' a 3' nepřekládaných sekvencí na expresi GUS byly také vyhodnoceny v transgenních rostlinách typu pšenice. Postup použitý pro transformaci a regeneraci pšenice byl proveden tak, jak uvádí patent US 5 631 152, zde zařazený v dodatcích, ale byl upraven pro selekci G418. Nezralá embrya byla kultivována na CM4C médiu po dobu 0 až 4 dní (CM4C složky: 4,3 g/l Gibco MS solí, 10 ml/l MS vitaminů (100X), 0,5 ml/l 2,4-D, 40 g/l maltózy, 0,5 g/l glutaminu, 0,75 g/l chloridu horečnatého, 0,1 g/l kasein hydrolyzátu, 1,95 g/l MES, 2 g/l fytagelu); kultury byly přeneseny do CM4C Raff/Mann média na asi 4 dny, ostřelovány a přeneseny do CM4C obsahujícího 25 mg/l G418 na dobu asi 5 dní; kultury regenerovaly na MMS0,2C s obsahem G418 (25 mg/l) po dobu asi 19 dní, na MMS0C s obsahem 25 mg/l G418 po dobu asi 33 dní a zakořenily na MMS0C s obsahem 25 mg/l G418 po době asi 57 dní a pak byly přeneseny do půdy na asi 75 dní. CM4C (G418) médium obsahující 2,2 ml/l 1 mg/ml pichloramu, 1 ml/l G418 (25 mg/ml) a 2 ml/l kyseliny askorbové (50 mg/ml stock). Médium CM4C Raff/Mann 0,25 obsahovalo následující složky: 4,4 g/l MS solí, 10 ml/l MS vitaminů (100X), 0,5 ml/l 2,4 až 0,40 g/l maltózy, 74,3 g/l rafinózy, 22,78 g/l manitolu, 0,5 g/l glutaminu, 0,75 g/l chloridu horečnatého, 1,95 g/l MES, 0,1 g/l kasein hydrolyzátu, 2 g/l fytagelu, 2,2 ml pichloramu (1 mg/ml) a 2 ml askorbové kyseliny (50 mg/ml). MMS0,2C médium obsahující 4,3 g/l MS solí, 1,95 g/l MES, 2 ml/l MMS vitaminů, 0,2 ml/l 2,4-D, 40 g/l maltózy a 2 g/l agaru (Schweizer Hall). Médium MM20,2C (G418) obsahovalo 1 ml 25 mg/ml G418 a 2 ml 50 mg/ml kyseliny askorbové, MMS0C obsahovalo 4,3 g/l MS solí, 1,95 g/l MES, 2,0 ml/l MMS vitaminů a 40 g/l maltózy. MMS0C (G418) obsahovalo přírůstek 1 ml 25 mg/ml G418 a 2 ml 50 mg/ml kyseliny askorbové. Transgenní linie byly ustanoveny s použitím DNA konstruktů, které jsou popsány v dále uvedené tabulce 7 a rostliny byly vyhodnoceny na úrovně aktivity GUS.

Poměrné úrovně GUS byly srovnatelné nebo větší než základní kontrolní vektor pro mnohé z konstruktů obsahujících nepřekládané elementy podle vynálezu. Zvláště konstrukty obsahující Ta cab nebo Ta fbp 5' nepřekládané vedoucí sekvence použité v kombinaci s Ta hsp nebo Ta fbp 3' nepřekládanými terminačními sekvencemi měly za následek vysoké úrovně exprese. Jiné výhodné konstrukty obsahovaly Ta fbp 5' nepřekládanou vedoucí sekvenci a 3' nepřekládanou nos terminační oblast.

35

Tabulka 7

Účinek 5' nepřekládané vedoucí sekvence a 3' nepřekládanou terminační sekvencí genových elementů na stabilní expresi GUS v transgenních rostlinách typu pšenice.

40

konstrukt	vedoucí sekv./intro n/3'	n	průměrná GUS aktivita	Poměrná průměrná hodnota	rozsah aktivity GUS nízká – vysoká	poměrná vysoká hodnota
pMON26044	Ta cab/rýžový aktin/nos	5	20,7±28,1	0,7	0,6 – 72,7	1,0
pMON26052	Ta hsp/hsp-70/nos	9	11,1±9,6	0,4	0,6-26,3	0,4

pMON26055	Ta hsp/rýžový aktin/nos	4	15,3±24,1	0,6	0,6 – 57,0	0,8
pMON26064	Ta fbp/rýžový aktin/nos	4	72,1±102,3	2,6	1,0 – 248,6	3,5
pMON32502	Ta cab/rýžový aktin/Ta hsp	55	82,8±135,6	3,0	0,6 – 779,8	11,0
pMON32509	Ta fbp/rýžový aktin/Ta ubiq	6	25,6±24,0	0,9	1,7 – 71,2	1,0
pMON32513	Ta fbp/rýžový aktin/Ta fbp	10	86,1±62,6	3,1	17,0- 244,8	3,4

Hodnoty aktivity GUS jsou vždy vyjádřeny jako pmol/min/mg protein

5

n – počet nezávislých testovaných rostlin typu pšenice

10

Procento GUS pozitivních výsledků v transgenních rostlin typu pšenice bylo použito k určení účinku 5' nepřekládané vedoucí sekvence a 3' nepřekládané terminační sekvence na obnovu stabilní exprese GUS. Konstrukty, které dosahují vysoké úrovně exprese GUS v tabulce 7 způsobují také vysoké procento GUS pozitivních výsledků (tabulka 8).

Tabulka 8

5 Účinek 5' nepřekládané vedoucí sekvence a 3' nepřekládané terminační sekvence genových elementů na obnovení stabilní exprese GUS nad podkladem hraničních úrovní v transgenních rostlinách typu pšenice.

Konstrukt	Vedoucí sekv./intron/3'	množství rostlin	množství výsledků	GUS pozitivní výsledky	% GUS pozitivních výsledků
pMON19468	base/hsp 70/nos	29	14	2	14
pMON26044	Ta cab/rýžový aktin/nos	17	11	4	36
pMON26052	Ta hsp/hsp 70/nos	31	22	5	23
pMON26055	Ta hsp/rýžový aktin/nos	20	15	4	27
pMON26064	Ta fbp/rýžový aktin/nos	9	8	4	50
pMON32502	Ta cab/rýžový aktin/Ta	122	58	33	57
	hsp				
pMON32509	Ta fbp/rýžový aktin/Ta ubich	20	15	4	27
pMON32513	Ta fbp/rýžový aktin/Ta fbp	44	37	16	43

10

Tabulka 9

Účinek 5' nepřekládaných vedoucích sekvencí na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů

Konstrukt	5' vedoucí sekv.	intron	3' terminační sekv.	poměr GUS/LUX
pMON8677	základní syntetická	žádný	nos	1,0
pMON26038	Ta cab	žádný	nos	12,7
pMON26043	Ta hsp	žádný	nos	7,1
pMON26046	Ta hsp	žádný	nos	6,2
pMON33219	r amyl	žádný	nos	1,7

15

Tabulka 10

Účinek 5' nepřekládaných vedoucích sekvencí na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů

5

Konstrukt	5' vedoucí sekv.	intron	3' terminační sekv.	poměr exprese GUS/LUX
pMON33210	základní syntetická	hsp70	nos	1,0
pMON33220	r btub	hsp70	nos	1,5

Účinek různých 5' nepřekládaných vedoucích sekvencí na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů byl měřen s použitím konstruktů, které obsahovaly různé 5' nepřekládané vedoucí sekvence (tabulky 9 a 10). Expese GUS v protoplastech kukuřičných listů byla zvýšená v případě, že byly použity 5' nepřekládané vedoucí sekvence vazebného proteinu chlorofylu a/b (Ta cab), pšeničného proteinu tepelného šoku (Ta hsp), pšeničné peroxidázy (Ta per) nebo rýžového beta-tubulinu (r btub).

15

Tabulka 11

Účinek intronů na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů

Konstrukt	5' vedoucí sekvence	intron	3' terminační sekvence	poměr exprese GUS/LUX
pMON8677	základní syntetická	žádný	nos	1,0
pMON33211	základní syntetická	r amy1	nos	5,6
pMON3226	základní syntetická	r pal	nos	2,5
pMON3228	základní syntetická	r ss1	nos	2,3

20

Účinek různých intronů na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů byl měřen s použitím konstruktů, které obsahovaly různé introny. Expese GUS v protoplastech kukuřičných listů byla zvýšená v případě, že byly použity rýžové introny první amylázy (r amy 1), fenylalanin amonium-lygázy (r pal) nebo první sacharózové syntetázy (ss 1).

25

Tabulka 12

Účinek 3' nepřekládaných terminačních oblastí na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů

5

konstrukt	5' nepřekládaná vedoucí sekv.	intron	3' nepřekládaná terminační sekv.	poměr exprese GUS/LUX
pMON26044	Ta cab	rýžový aktin	nos	1,0
pMON33225	Ta cab	rýžový aktin	r glut	4,0
pMON33218	Ta cab	rýžový aktin	r lacd	4,5
pMON33216	Ta cab	rýžový aktin	r btub	3,6

Účinek různých 3' nepřekládaných terminačních sekvencí na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů byl měřen s použitím konstruktů, které obsahovaly různé 3' nepřekládané terminační sekvence. Expese GUS v protoplastech kukuřičných listů byla zvýšená v případě, že byly použity 3' nepřekládané terminační sekvence rýžového glutelinu typ II (r glut), rýžové laktát dehydrogenázy (r lacd) nebo rýžového beta-tubulinu (r btub) ve srovnání s kontrolním konstruktem, který obsahoval nos 3' nepřekládanou terminační sekvenci.

15

Tabulka 13

Kombinované účinky 5' a 3' nepřekládaných terminačních sekvencí na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů

20

Konstrukt	5' nepřekládaná vedoucí sekv.	intron	3' nepřekládaná terminační sekv.	poměr exprese GUS/LUX
PMON19469	základní syntetická	hsp 70	nos	1,0
PMON33218	Ta cab	rýžový aktin	r lacd	2,8
PMON33225	Tacab	rýžový aktin	r glut	3,1
PMON47901	Ta cab	rýžový aktin	r glut	2,7
pMON47906	Ta hsp	rýžový aktin	r lacd	3,2
pMON47907	Ta hsp	rýžový aktin	r glut	3,5
pMON47915	Ta per	rýžový aktin	r lacd	3,4
pMON47916	Ta per	rýžový aktin	r glut	3,9
pMON47919	Ta per	hsp70	r btub	3,2
pMON47917	Ta per	rýžový aktin	r btub	2,4
pMON32502	Ta cab	rýžový aktin	Ta hsp	3,0

Tabulka 14

Účinek různých vedoucích sekvencí na expresi GUS v protoplastech kukuřičných listů

5

konstrukt	5' nepřekládaná vedoucí sekv.	intron	3' nepřekládaná terminační sekv.	poměr exprese GUS/LUX
pMON8677	žádný	hsp70	nos	1,0
pMON33219	r amy	hsp70	nos	1,65
pMON26038	Ta cab	žádný	nos	12,74
pMON26043	Ta hsp	žádný	nos	7,11
pMON26046	Ta per	žádný	nos	6,16
pMON33210	žádný	hsp70	nos	1,0

Úroveň zvýšení exprese pro strukturální DNA se může měnit i z jiných důvodů než je 5' nepřekládaná vedoucí sekvence, 3' nepřekládaná terminační sekvence nebo intronová sekvence. K těmto důvodům mohou patřit: místa zahajující transkripci, polyadenylační místa, transkripční terminační signály, transportní signály škodujícími oblastmi, atd. Stejně sekvence mohou poskytnout různé úrovně exprese v závislosti na druhu, ve kterém exprese probíhá a přesném složení sekvence a může vyžadovat nějaký stupeň optimalizační rutiny pro lepší výsledky v různých rostlinných druzích.

15

Určité znaky a dílčí kombinace podle vynálezu mohou být použity bez souvislosti s dalšími rysy a dílčími kombinacemi. To odpovídá nárokům vynálezu. Protože může být provedeno mnoho příkladů provedení podle vynálezu bez odchýlení od myšlenky vynálezu, je samozřejmé, že všechny látky zde uváděné nebo ukázané v následujících obrázcích, slouží pouze k vysvětlení a ilustraci a vynález na ně není omezen.

20

Všechny zde popsané a nárokováné kompozice a způsoby mohou být použity bez dalšího testování. Pokud jsou kompozice a způsoby podle vynálezu popsány termínem výhodný příklad použití, je odborníkům vdané oblasti zřejmé, že lze použít obměny použitých DNA molekul a obměny v krocích nebo sekvencích kroků způsobu zde popsaného, bez odchýlení od ducha vynálezu. Přesněji, je zřejmé, že určitá činidla, ať už chemická nebo fyziologická, mohou být zaměněna za činidla zde popsaná, přičemž bude dosaženo stejných nebo podobných výsledků. Všechny takové podobné záměny a úpravy zřejmé odborníkům v dané oblasti nenarušují duch, oblast ani koncepci vynálezu, jak je zřejmé z následujících patentových nároků.

30

Použitá literatura

Následující odkazy poskytující procedurální nebo jiné detaily, které doplňují ty, které zde byly uvedeny, jsou zde zařazeny v dodatcích.

35

Bird and Ray, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 9: 207–27 (1991)

Birren a kol., *Genome Analysis: Analyzing DNA*, Cold Spring Harbor, New York (1996)

Bouhida a kol., *Journal General Virology* (1993) vol. 74 str. 15–22.

Callis a kol., *Genes and Develop*, 1: 1183–1200 (1987)

40

Carrington a Freed, *J. of Vir.* 64, 1590–1597 (1990)

- Coruzzi a kol., EMBO J, (1984) vol.3 str. 1671–1679.
- Dellaporta a kol., Stadler Symposium 11 :263–282 (1988)
- Dietrich a kol., J. Cell Biol. 105,67, (1987)
- Fromm a kol., Methods Enzymol. 153, 351–366 (1987)
- 5 Gallie a kol., NAR 15,8693–8711 (1987)
- Gallie a kol., The Plant Cell 1:301–311 (1989)
- Gelvin a kol., In: Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Publishers (1990)
- Gibson and Shillitoe, Molecular Biotech. 7(2) 125–37 (1997)
- Goff a kol., EMBO J. 9: 2517–2522 (1990)
- 10 Hattori a kol., Genes Dev. 6: 609–618 (1992)
- Hinchee a kol., Bio/Technology 6:915–922 (1988)
- Hinchee a kol., Plant Transformation, In PLANT CELL AND TISSUE CULTURE, 231–270,1994, Vasil and Thorpe (Eds.), Dordrecht Publishing, Netherlands.
- Ikatu a kol., Bio/Technol. 8:241–242 (1990)
- 15 Innes a kol., In: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press. San Diego, 1990
- Jackson a kol., TIBS 15,477–483 (1990)
- Jefferson a kol., EMBO J. 6: 3901–3907 (1987)
- Jefferson, Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387–405 (1987)
- 20 Jobling a Gehrke, Nature 325, 622–625 (1987)
- Jorgensen, Trends in Biotech 8(12) 340–44 (1990)
- Joshi, Nud Acids Res 15: 6643–6653, 1987
- Katz a kol, J. Gen. Microbiol. 129:2703–2714 (1983)
- Klein a kol., Bio/Technology 6:559–563.
- 25 Kozak, Cell 44,283–292 (1986)
- Kozak, Mol. and Cell. Biol. 8,2737–2744 (1988)
- Koziel a kol.. Plant Mol. Biol. 32:393–405 (1996)
- Li a kol., Molecular Breeding (1997) vol. 3 str. 1–14.
- Mailga a kol., Methods in Plant Molecular Biology. Cold Spring Harbor Press (1995)
- 30 Marcotte a kol., Nature, 335: 454–457 (1988)
- Marcotte a kol., Plant Cell, 1: 523–532 (1989)
- Mascarenkas a kol., Plant Mol. Biol., 15, 913–920 (1990)
- McCarty a kol.. Cell 66: 895–905 (1991)
- McElroy a kol., Plant Cell, 2:163–71 (1990)
- 35 McElroy a kol., Mol. Gen. Genet. 231: 150–160 (1991)
- Medberry a Olszewski, Plant Journal (1993) vol. 3 str. 619–626.
- Moffan a kol.. Gene (1994) vol 143 str. 211 –216.
- Moldave, Ann, Rev. Biochem. 54, 1109–1149 (1985)
- Ni a kol.. Plant J. (1995) vol. 7 str. 661–676.
- 40 Odell a kol., Nature (1985) vol. 313 str. 810–812.
- Ow a kol.. Science 234: 856–859 (1986)
- Pain, Biochem. J. 235–625–637 (1986)

- Pelletier and Sonenberg, *Cell* 40, 515–526 (1985)
- Potrykus a kol., *Mol. Gen. Genet.* 199: 183–188 (1985)
- Pouwels a kol., In *Cloning Vectors. A Laboratory Manual.* 1985 supp., 1987
- Ritchie a kol., In *TRANSGENIC PLANTS*, Vol. 1.147–177, 1993. Kung and Wu (Eds.).
5 *Academie Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers.*
- Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press (1989)
- Sanger a kol., *Plant Mol. Biol.* (1990) vol. 14 str. 433–443
- Schledzewski a kol., *Transgenic Research* (1994) 3: 249–255
- Schuch, *Symposia of the Society for Experimental Biology* 45: 117–27 (1991)
- 10 Sheen a kol., *Plant Cell* 3(3) 225–245 (1991)
- Skuzeski a kol., *Plant mol. Biol.* 15, 65– 79 (1990)
- Sonenberg, *Curr. Top. Micro. and Imm.* 161, 23–47 (1990)
- Songstad a kol., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32: 179–183 (1995)
- Stalker a kol., *J. Biol. Chem.* 263 :6310–6314 (1988)
- 15 Stefanov a kol., *Acta Biologica Hungarica* (1991) 42: 323–330
- Steinbiss a kol., *Subcellular Biochem.* (1991) 17: 143–166
- Sutcliffe a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 75: 3737–3741 (1978)
- Tanaka, *Nucl. Acids Res.* 18:6767–6770. 1990
- Thillet a kol., *J. Biol. Chem.* 263: 12500–12508 (1988)
- 20 Vasil a kol., *Bio/Technology* 10:667, (1992)
- Wang a kol., *Plant Mol. Biol.*, 19:881–885 (1992)
- Weissbach a Weisbach, In *Methods for Plant Molecular Biology*, Academie Press. 1989
- Wen a kol., *Chinese J. of Bot.* (1993) vol. 5 str. 102–109
- Xu a kol., *Plant Physiology* (1994) vol. 106 str. 459–467
- 25 Zhong a kol., *Plant Science* (1996) vol. 116 str. 73–84
- Zhou. H. a kol., *Plant Cell Reports* (1993) 12: 612–616
- Zhu a kol., *Plant Mol. Biol.* 29:535–550 (1995)
- Zukowsky a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 80:1101–1105 (1983)

30

PATENTOVÉ NÁROKY

35

1. Rekombinantní molekula DNA, která obsahuje funkčně připojené ve směru 5', 3':
 - (a) promotorovou sekvenci, která je funkční v rostlinách;
 - 40 (b) 5' nepřekládanou vedoucí sekvenci SEQ NO 52 izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro vazebný protein chlorofylu a/b;
 - (c) sekvenci intronů, vybranou ze sekvencí SEQ NO 47 až 51, izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z rýžového genu pro aktin, rýžového genu pro sacharózasyntázu, rýžového genu pro fenylalaninamoniumlygázu, rýžového genu pro amylázu a kukuřičného genu pro protein tepelného šoku;
 - 45

- (d) kódující sekvenci DNA, která je funkční v rostlinách a
- (e) 3' nepřekládanou terminační sekvenci, vybranou ze sekvencí SEQ NO 58 až 63, izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro protein tepelného šoku, pšeničného genu ubichitinu, pšeničného genu pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu, rýžového genu pro glutelin, rýžového genu pro laktátdehydrogenázu a rýžového genu pro beta-tubulin.
2. Molekula DNA podle nároku 1, kde sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro aktin.
3. Molekula DNA podle nároku 1, kde sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené s genem pro sacharózasyntázu.
4. Molekula DNA podle nároku 1, kde sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro fenylalaninamoniolygázu.
5. Molekula DNA podle nároku 1, kde sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro amylázu.
6. Molekula DNA podle nároku 1, kde 3' nepřekládaná terminační oblast je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro glutelin.
7. Molekula DNA podle nároku 1, kde 3' nepřekládaná terminační oblast je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro laktátdehydrogenázu.
8. Molekula DNA podle nároku 1, kde 3' nepřekládaná terminační oblast je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro beta-tubulin.
9. Molekula DNA podle nároku 1, kde 3' nepřekládaná terminační oblast je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro protein tepelného šoku.
10. Molekula DNA podle nároku 1, kde 3' nepřekládaná terminační oblast je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro ubichitin.
11. Molekula DNA podle nároku 1, kde 3' nepřekládaná terminační oblast je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu.
12. Molekula DNA podle nároku 1, kde 5' nepřekládaná vedoucí sekvence je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro vazebný protein chlorofylu a/b, sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro aktin a 3' nepřekládaná oblast je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro protein tepelného šoku.
13. Molekula DNA podle nároku 1, kde 5' nepřekládaná vedoucí sekvence je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro vazebný protein chlorofylu a/b, sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro aktin a 3' nepřekládaná terminační oblast je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu.
14. Molekula DNA podle nároku 1, kde promotor je konstitutivní, indukibilní, vývojově regulovaný, chemicky regulovaný, ve tkáni rozšířený nebo pro tkáň specifický.
15. Molekula DNA podle nároku 1, kde DNA kódující sekvence má negativní orientaci.

16. Molekula DNA podle nároku 1, kde DNA kódující sekvence má pozitivní orientaci.
17. Transformovaná buňka obsahující rekombinantní DNA molekulu, která obsahuje funkčně spojené ve směru 5', 3'
- (a) sekvenci promotoru;
- (b) 5' nepřekládanou sekvenci izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro vazebný protein chlorofylu a/b a jeho funkčně ekvivalentních variant;
- (c) sekvenci intronů izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z rýžového genu pro aktin, rýžového genu pro syntetázu sacharózy, rýžového genu pro fenylalaninamoniumlygázu a kukuřičného genu pro protein tepelného šoku a jejich funkčně ekvivalentních variant;
- (d) kódující sekvenci DNA a
- (e) 3' nepřekládanou terminační sekvenci izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro protein tepelného šoku, pšeničného genu ubichitin, pšeničného genu pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu, rýžového genu pro glutelin, rýžového genu pro laktátdehydrogenázu a rýžového genu pro beta-tubulin a jejich funkčně ekvivalentních variant.
18. Transformovaná buňka podle nároku 17, kde buňka je rostlinná buňka, bakteriální buňka nebo vir.
19. Transformovaná buňka podle nároku 17, kde buňka je rostlinná buňka.
20. Rostlina obsahující rostlinnou buňku podle nároku 19.
21. Rostlina podle nároku 20, kde rostlina je dvouděložná.
22. Rostlina podle nároku 20, kde rostlina je jednoděložná.
23. Rostlina podle nároku 20, kde rostlina je vybrána ze skupiny sestávající z vojtěšky, ječmene, ova, kukuřice, rýže, žita a pšenice.
24. Rostlina podle nároku 22, kde rostlina je rostlina pšenice.
25. Rostlina podle nároku 22, kde rostlina je rostlina kukuřice.
26. Způsob pro zlepšení genové exprese v rostlinách, přičemž
- (b) rostlinné buňky s rekombinantní molekulou DNA, která obsahuje, funkčně spojené ve směru 5', 3'
- (i) promotorovou sekvenci;
- (ii) 5' nepřekládanou vedoucí sekvenci spojenou s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro vazebný protein chlorofylu a/b a jeho funkčně ekvivalentních variant;
- (iii) kódující sekvenci DNA;

- (iv) sekvenci intronů spojenou s genem vybraným ze skupiny sestávající z rýžového genu pro aktin, rýžového genu pro sacharózasyntázu, rýžového genu pro fenylalaninamoni-
umlygázu a jejich funkčně ekvivalentních variant a
- 5
- (v) 3' nepřekládanou terminační sekvenci spojenou s genem vybraným ze skupiny sestávající z pšeničného genu pro protein tepelného šoku, pšeničného genu ubichitin, pšeničného genu pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu, rýžového genu pro glutelin, rýžového genu pro laktátdehydrogenázu a rýžového genu pro betatubulin a jejich funkčně ekvivalentních
10 variant, se transformují;
- (b) rostlinné buňky, které byly transformovány, se vyberou; a
- (c) regenerují se pro získání odlišné rostliny.
- 15
27. Způsob podle nároku 26, kde sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro aktin.
28. Způsob podle nároku 26, kde sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené
20 s rýžovým genem pro sacharózasyntázu.
29. Způsob podle nároku 26, kde sekvence intronů je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro fenylalaninamoni-lygázu.
- 25
30. Způsob podle nároku 26, kde 3' nepřekládaná terminační sekvence je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro glutellin.
31. Způsob podle nároku 26, kde 3' nepřekládaná terminační sekvence je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro laktátdehydrogenázu.
- 30
32. Způsob podle nároku 26, kde 3' nepřekládaná terminační sekvence je izolována z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro beta-tubulin.
33. Způsob podle nároku 26, kde 3' nepřekládaná terminační sekvence je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro protein tepelného šoku.
- 35
34. Způsob podle nároku 26, kde 3' nepřekládaná terminační sekvence je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro ubichitin.
- 40
35. Způsob podle nároku 26, kde 3' nepřekládaná terminační sekvence je izolována z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu.
36. Způsob podle nároku 26, kde rekombinantní molekula DNA obsahuje 5' nepřekládanou vedoucí sekvenci izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro vazebný
45 protein chlorofylu a/b, sekvenci intronů izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro aktin a 3' nepřekládanou oblast izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro protein tepelného šoku.
37. Způsob podle nároku 26, kde rekombinantní molekula DNA obsahuje 5' nepřekládanou vedoucí sekvenci izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro vazebný
50 protein chlorofylu a/b, sekvenci intronů izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s rýžovým genem pro aktin a 3' nepřekládanou oblast izolovanou z nukleotidové sekvence spojené s pšeničným genem pro fruktóza-1,6-bisfosfatázu.
38. Způsob podle nároku 26, kde DNA kódující sekvence má negativní orientaci.
- 55

39. Způsob podle nároku 26, kde DNA kódující sekvence má pozitivní orientaci.

5 40. Způsob podle nároku 26, kde promotor je konstitutivní, inducibilní, vývojově regulovaný, chemicky regulovaný, rozšířený ve tkáni nebo pro tkáň specifický.

10

15 stránek sekvencí
+
28 výkresů

Seznam sekvencí

<110> Conner. Timothy W
Santino. Colleen G

<120> Nové rostlinné expresní vektory

<130> jednoděložné elementy

<140>

<141>

<150> 60/097150

<151> 1998-08-19

<160> 63

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 1

gatggatcct ctagaaccat ctccacaca ctcaag 36

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 2

gatccatggc gcagatctta tgggtgtgtg tccc 34

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 3

gatccaaggg agg 13

<210> 4
<211> 9
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 4
cctcccttg 9

<210>5
<211> 48
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 5
gatcctctag agaattccct ttcctacct acgatccgat accgaatt 48

<210> 6
<411>37
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 6
ttccgagcgc acaagccaaa ccaaagcaag atctgac 37

<210>7
<211>35
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 7
tcggatcgta ggtaggaaaa gggaattctc tagag 35

<210>8
<211 > 50
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 8

catggtcaga tcttgcttg gttggcttg tgcgctcgga aaattcgga 50

<210> 9

<211>49

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 9

gatcctctag agggccacca ccacggtgcg cgccaagaca aggcagggg 49

<210> 10

<211>31

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 10

agagaaattc gtcaatccgc agcagatctg c 31

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 11

gtcttgccgc gcaccgtggt ggtggcctc tagag 35

<210> 12

<211> 45

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 12

catggcagat ctgctgogga ttgacgaatt tctctccct gcctt 45

<210> 13
<211> 12
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 13
gatctacggg gt 12

<210> 14
<211> 12
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná
<400> 14
ctagaccccg ta 12

<210> 15
<211>31
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<213> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 15
aggaattcgc tcctggccat ggagctgctt c 31

<210> 16
<211> 55
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná
<400> 16
agggatccaa aaaacacaca cagatctccg ctcactatt catagttcac caaag 55

<210> 17
<211> 31
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 17
aggaattctg catgcgtttg gacgtatgct c 31

<210> 18
<211> 56
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 18
agggatccaa aaaacacaca cagatctaatt tcttttttt ttgcactcaa aatcag 56

<210> 19
<211> 32
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 19
aggaattcaa caagaacgag ggagggatac ac 32

<210> 20
<211> 54
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 20
agggatccaa aaaacacaca cagatctctt gacctcaaa tccaattgga attc 54

<210> 21
<211> 35
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic

<400> 21
gtgtccaccc acccctgat ctctgctcg ccgcc 35

<210> 22
<211> 43
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 22

gccgatcggg tgcggtggtt ggatcatcac aactcggcaa aga 43

<210> 23

<211> 43

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 23

cgatcggcgg cggcgagcga gagatcgagg ggtgggtgga cac 43

<210> 24

<211> 38

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 24

gatctcttg ccgagttgtg atgatccacc acgcatc 38

<210> 25

<211> 56

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 25

gatcctctag aaccaccaca cactccacc agtaagaagt gcagcaggta gctagt 56

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 26

aagccggcgt agctttgctc ttgcagctag agatctaac 39

<210> 27
<211> 42
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 27
tgctgcactt ctactggg gagtggtg ggggtctag ag 42

<210> 28
<211> 53
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 28
catggttaga tctctagctg caagagcaaa gctacgccgg ctactagct acc 53

<210> 29
<211> 32
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic

<400> 29
tagtagat ctctgttc agtaagaga tc 32

<210> 30
<211> 32
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 30
tagtagtcta gaagtgat cctgcatca tc 32

<210> 31
<211> 29
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 31

tagtagagat ctgagctcat caggtgagg 29

<210> 32

<211> 32

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 32

tagtagtcta gaccgggatt gaggaatctg cc 32

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 33

tagtagagat ctccaccatt gggtatgtg c 31

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 34

tagtagtcta gaatttcagg aactgcaaag aaagg 35

<210> 35

<211> 31

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 35

tagtaggaat tcgttgcaa tgcggataaa g 31

<210> 36
<211> 33
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 36
tagtaggcat gcccataaga taaggaggg ttg 33

<210> 37
<211> 29
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 37
tagtaggaat tctaaatctt attattatc 29

<210> 38
<211> 31
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<200>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 38
tagtaggcat gctcgacaat aagtactgt c 31

<210> 39
<211> 31
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 39
tagtaggaat tcggtggcct ttgcttggtg g 31

<210> 40
<211> 31
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 40

tagtaggcat gcaagatcca tatgcctata g 31

<210> 41

<211> 40

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 41

gtgatccatc atctacaaga gatcgatcag tagtggttag 40

<210> 42

<211> 47

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 42

gttgctgcta accactactg atcgatctct ttagatgat ggatcac 4

<210> 43

<211> 41

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 43

cagcaactca ctatcgaaca cggtttcagc ttacacagat a 41

<210> 44

<211> 38

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 44

gatctatctg tgtaagctga aaccgtgttc gatagtga 38

<210> 45

<211> 29

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 45

cacgctgaca agctgactct agcagatct 29

<210> 46

<211> 253

<212> DNA

<213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 46

gatcgtcaa acattggca ataaagttc ttaagattga atcctgttgc cggcttgcg 60
 atgattaca tataattct gtgaattac gtaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggTTTTatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgcg ggtgcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> 47

<211> 804

<212> DNA

<213> *Zea mays*

<400> 47

accgtcttcg gtacgcgctc actccgccct ctgcctttgt tactgccacg tttctctgaa 60
 tgcctctctg tgtggtgatt gctgagagtg gtttagctgg atctagaatt acactctgaa 120
 atcgtgttct gctgtgctg attactgcc gtcctttgta gcagcaaaat atagggacat 180
 ggtagtacga aacgaagata gaacctacac agcaatacga gaaatgtgta attggtgct 240
 tagcgggtatt tattaagca catgttggtg ttatagggca ctggattca gaagttgct 300
 gtaatttag gcacaggctt cactactacat gggccaatag tatagggatt catattatag 360
 gcgatactat aataattgt tctctgcag agcttattat ttgccaaaat tagatattcc 420
 tattctgitt ttgittgigt gctgttaaat tgtaacgcc tgaaggaata aatataaatg 480
 acgaaatth gatgtttatc tctgctcctt tattgtgacc ataagtcaag atcagatgca 540
 cttgttttaa atattgtgt ctgaagaaat aagtactgac agtattttga tgcattgatc 600
 tgcttggttg ttgtaacaaa atttaaaaat aaagagtth cttttgttg ctctccttac 660
 ctctgatgg tatctagtat ctaccaactg aactatatt gcttctctt acatacgtat 720
 cttgctcgat gccttctccc tagtggtgac cagtgttact cacatagtct ttgctcatt 780
 cattgtaatg cagataccaa gcgg 804

<210> 48

<211> 149

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 48

gactcgagct catcaggtga ggattagat tccaaataag cgataacgtt tacctggta 60
 ctgcgattag ttcagtttac tgtgaaatc ttggaccct tcttaattat aaattgctt 120
 gttttctcgg cagattcctc aatgccggt 149

<210> 49
 <211> 128
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 49
 gatctcctgt ttcaggttaag agatcgccat gagttgggtt tcaggcttca gtgaactgat 60
 cgggttttgt actgagccta agagaatgat gcagtgatgc tctgtgttt gatgatgatg 120
 cagggatt 128

<210> 50
 <211> 491
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 50
 cctcgcgcgc cgccggtaac caccocgecc ctctctctt tctttctccg tttttttc 60
 cgtctcggtc tcatctttg gccittgtag ttgggtggg cgagaggcgg ctctcgcgc 120
 gccagatcg gtgcgcggga ggggcgggat ctgcgcgctg gggctctcgc cgccgtggat 180
 cgggcccgga tctgcggggg aatggggctc tcggatgtag atctcgcgac cgccgttgt 240
 gggggagatg atgggggggt taaaattcc gccgtgctaa acaagatcag gaagagggga 300
 aaagggcaact atggtttata tttttatata ttctgctgc ttcgtcaggc ttagatgtc 360
 tagatcttc tttctctt ttgtgggtag aattgaatc cctcagcatt gttcatcgg 420
 agttttctt tcatgattt gtgacaaatg cagcctcgtg cggagcttt tttaggtag 480
 aagtatcaa c 491

<210> 51
 <211> 1186
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa

<400> 51
 ccaccattgg gtatgttct tccattgcca aactgttccc tttacccat aggctgattg 60
 atcttggctg tgtgatttt tcttgggtt ttgagctga ttcagcggcg ctgcagcct 120
 ctgacgtg gtcttgctc gccattct tgcgattctt tgggtggctg tcagctgaat 180
 ctgacaggag ttttctga catgttctt ggtttactgc ttcggtaaa tctgaaccaa 240
 gaggggggtt tctgctgcag tttagtgggt ttactatgag cggattcggg gtttcgagga 300
 aaaccggcaa aaaacctcaa atctcagacc tttagtttg ctgccaggt gctccgcccc 360
 attgcagagt tcttttccc cccaaattt ttttactg gtgcagtaag aatcgcgct 420
 cagtgattt ctgactcgt agtccgttga tactgtgtct tgcattacac tigtctgct 480
 taatctttt tcttctga ggaatgtct ggtgcctgct ggtggatggc gaacaaaaa 540
 tgaaggggtt tttttttg aactgagaaa aatcttggg ttttgggtg gattcttca 600
 tggatcgcg acctccgta tcttctct tgaictccc gcttgcggat tcataatatt 660
 cggaaactca tgttggctct gcttaactg tagccaaatc tcatactc cagggatctt 720
 tgcctctgc ctatcggatt taggaattag gatctaactg gtgctaatac taaagggtaa 780
 tttgaaacca tgcattata atttgcaaa gtttagata tgccatcgg atctcaatga 840

tactactaa aaccaacaa atccattga taaagctggt tctttatcc cttgaaaac 900
 atgtcagag tatattggt caggtgatt tatttgaat cagtactcgc actctgctc 960
 gtaaacata gatgcttca gttgtgtaga tgaacagct gttttagtt atgtttgat 1020
 ctccaatgc tttgtgta tgttattagt gttgatttag catggcttc ctgtcagag 1080
 atagtctgc aatgcttagt gatggctgt gactaattat tctgtgcaa gtgagtgggt 1140
 ttggtacgtg ttgctaagt taaccttct ttgcagttcc tgaat 1186

<210> 52

<211> 71

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 52

gatcctctag aaccatctc cacacactca agccacacta ttggagaaca cacagggaca 60
 acacaccata a 71

<210> 53

<211> 66

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220> .

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 53

gaattccctt ttctaccta cgtccgata ccgaatttc cgagcgcaca agccaaacca 60
 aagcaa 66

<210> 54

<211> 68

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 54

tctagaggc caccaccag gtgcgcgcca agacaaggca ggggagagaa attcgtcaat 60
 ccgcagca 68

<210> 55

<211> 82

<212> DNA

<213> Syntetizované sekvence

<220>

<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 55

tctagaacca ccacaccact ccaccagtaa gaagtgcagc aggtagctag taagccggcg 60

tagctttgct cttgcagcta ga 82

<210> 56
<211> 70
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 56
tcacccacc cctcgatctc tcgctcgccg ccgccgatcg gatcgcggtg tggatcatc 60
acaactcggc 70

<210> 57
<211> 74
<212> DNA
<213> Syntetizované sekvence

<220>
<223> Popis syntetizované sekvence: generovaná

<400> 57
atccatcatc tacaagagat cgatcagtag tggtagcag caactcacta tcgaacacgg 60
ttcagctta caca 74

<210> 58
<211> 234
<212> DNA
<213> Triticum aestivum

<400> 58
aattctgcat gcgttggac gtatgctcat tcaggttga gccatttgg ttgatgtgtg 60
tgcgagtct tgcgagtctg atgagacatc tctgtattgt gttctttcc ccagtgttt 120
ctgtactgt gtaatcggct aatcgccaac agattcggcg atgaataat gagaaataa 180
ttgtctgat ttgagtga aaaaaaagg aattagatct gtgtgtgtt ttg 234

<210> 59
<211> 231
<212> DNA
<213> Triticum aestivum

<400> 59
aatcgctcc tggccatgga gctgcttctg tctctgggtt cacaagtctc ggtgtctccg 60
gtatctcca atggagtctg gtctgtctct gtcgtgcct gactgtctt gttctgtac 120
catactgtga tgcagtgtta tcgtttgat ctcaaaact ctgctggtgt ggagcagctt 180
tggtaacta tgaataagt agcggagatc tgtgtgtgt ttttggatc c 231

<210> 60
<211> 131

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 60

aattcaacaa gaacgagggga gggatacaca ggctgtttct tccaagaaat tattgtaact 60
aatatataat gtagcccttt tcttgtgatg cggaaaatat atttgaagaa ttccaattgg 120
attgtgaggt c 131

<210> 61

<211> 236

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 61

ctaagttggc aatgccgata aagaataact aaataaataa ataaataat tgcaagcaat 60
tgcgttgctg ctatgtactg taaaagtttc ttataatc agttctgaat gctaaggaca 120
tccctcaaga tggcttttct attttgtgt tcccgtcca atgtactgtt cgtatcctct 180
tggagattca tcaatatgag aaaacagaga atggacaacc ctccctatc ttatgg 236

<210> 62

<211> 241

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 62

ttctaaatct tattattatc atcgtcgtcg tcgtctcgtc acggaattaa ttaaagtacc 60
tactccgtac ttagctagct acaataataa ggattcattg atcactacaa gagtgatcga 120
ctcgactgta gtatgtgtgt gcaatataat gtgctgtcta tcaacaacta ctagtattgt 180
cattttttc gaaccaggga actttttaat gataagaaga aaaagacaag tacttattgt 240
c 241

<210> 63

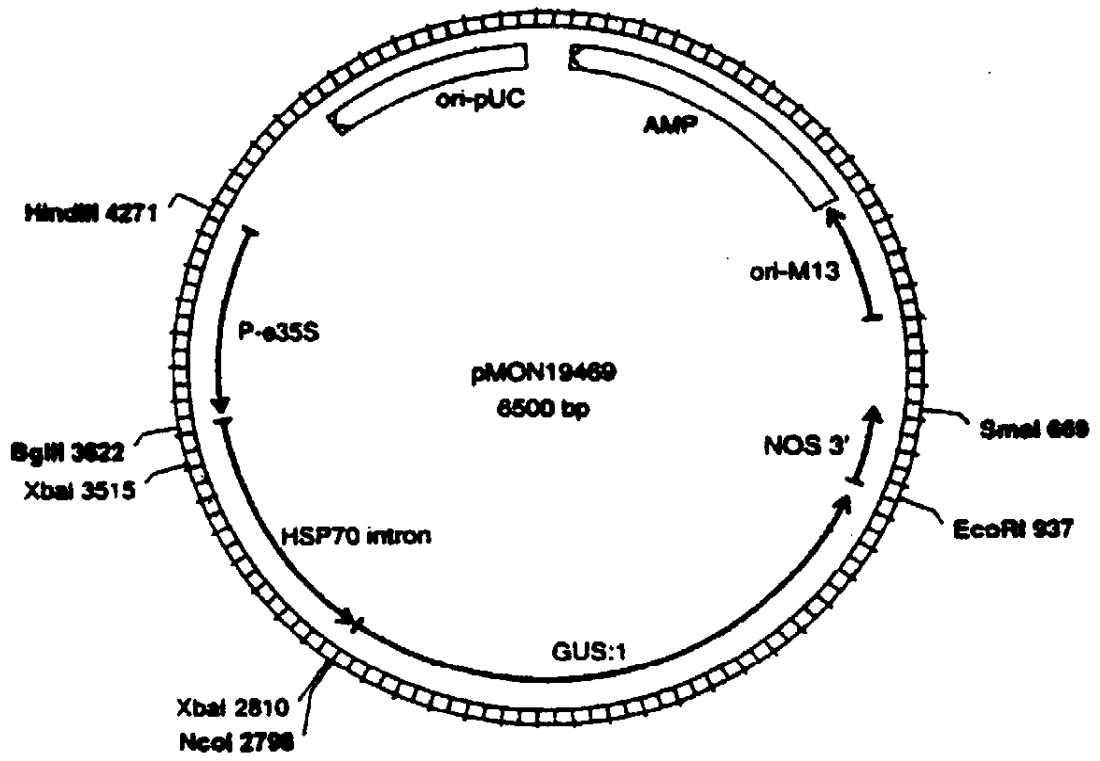
<211> 381

<212> DNA

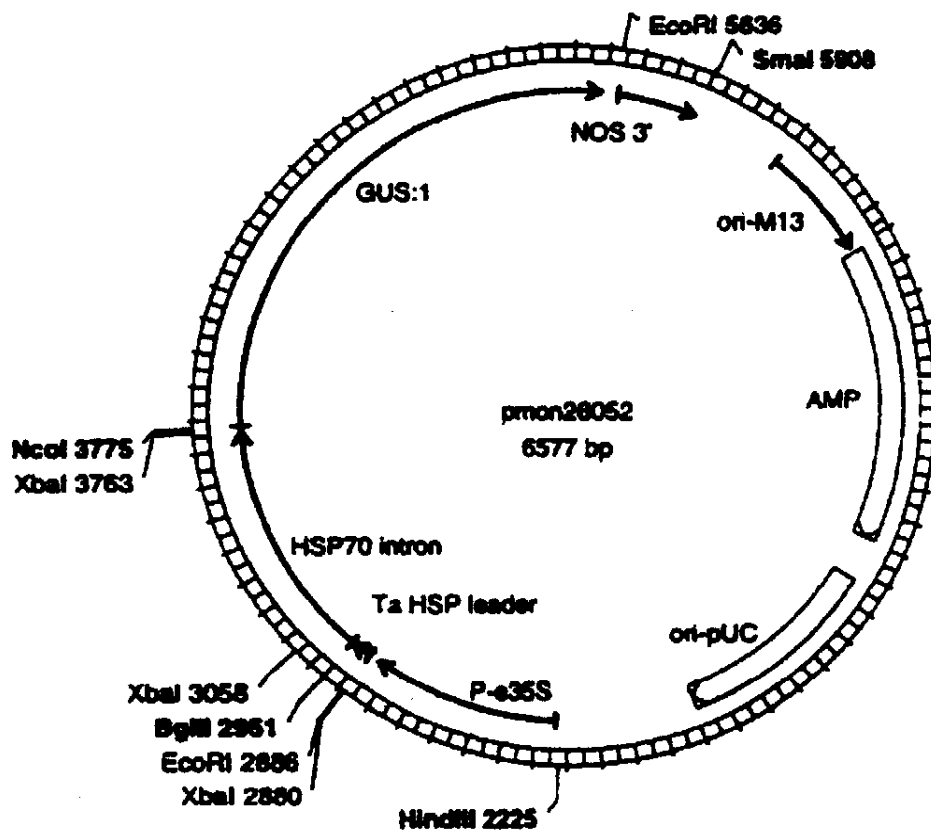
<213> Oryza sativa

<400> 63

attcggtggc tttgcttgg tggttctagg gcagggtttt gtgtgcttgg tgtttccgtc 60
ttacattatc accgtattac cgcctcgtac gccaccgccg gttcctatgt cttegccttg 120
tttttcgtc tgtgctatgg gaacctttt ggtactgta ttacttgatg ctggctcgcg 180
attgttgata ttccgggatg aattttacct ttccgcgttg gtccctcgtgt gtaataattg 240
caaattacgg aactaggaag gtagcccgcg caticgcgtg ggcattgtatc gtaggctgta 300
ttgagataa tcgtaagtaa taggctgatt gtgttaaat gttgcattg ttatatgta 360
aactataggc atatgatct t 381

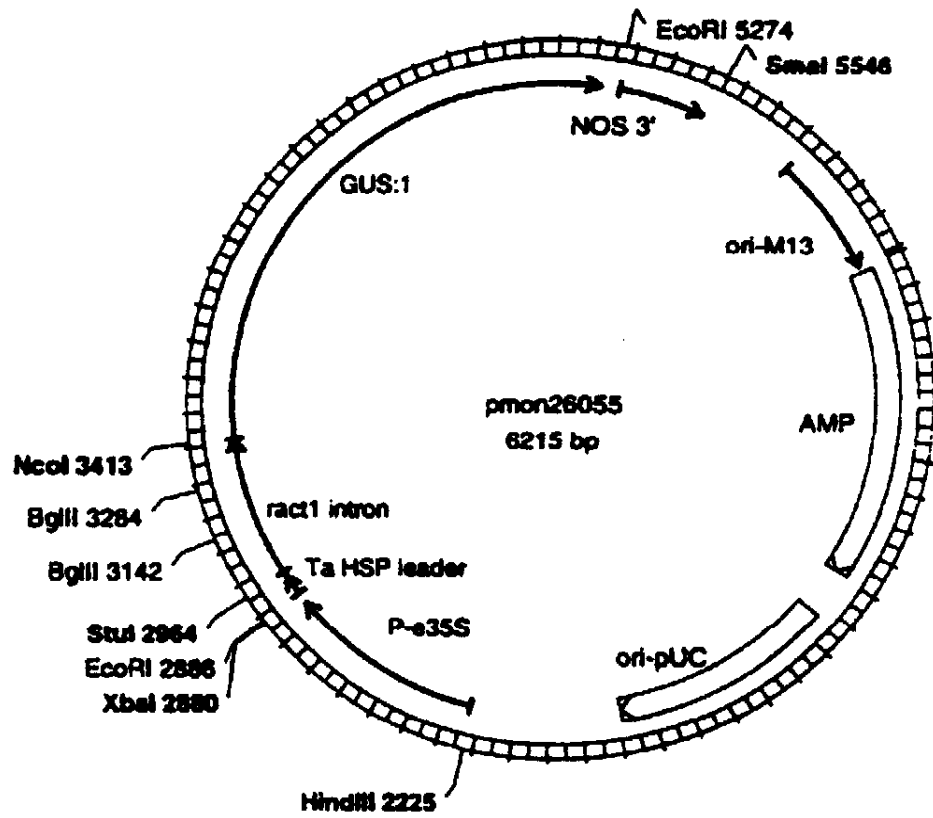


Obr. 1



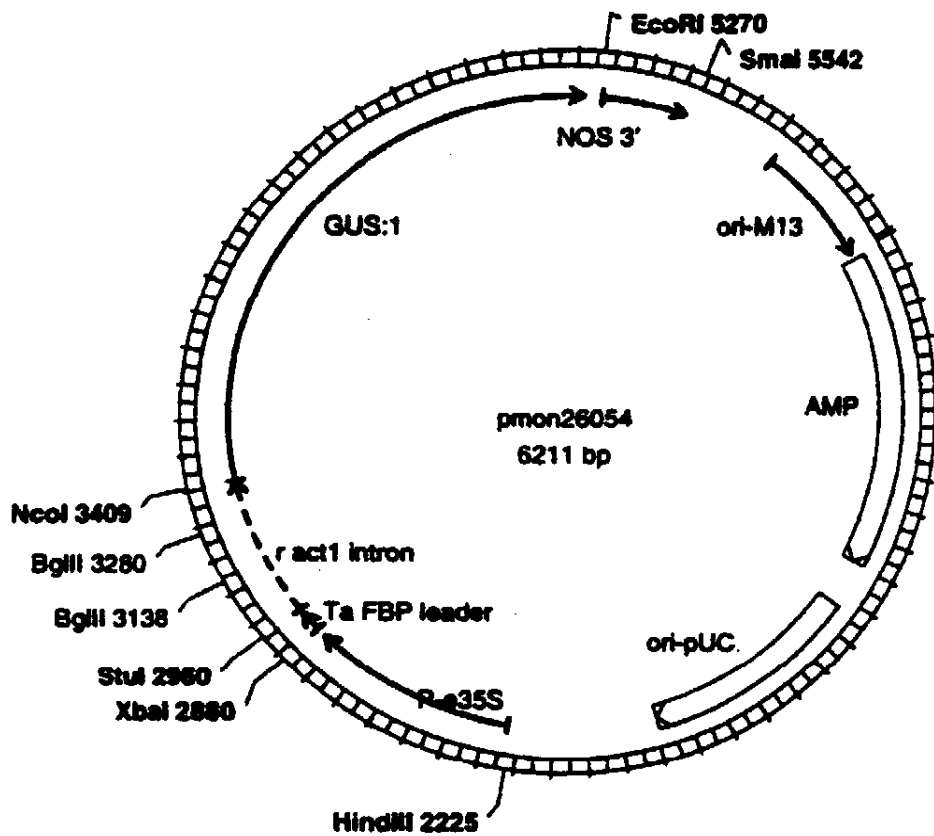
leader je vedoucí sekvence

Obr. 2



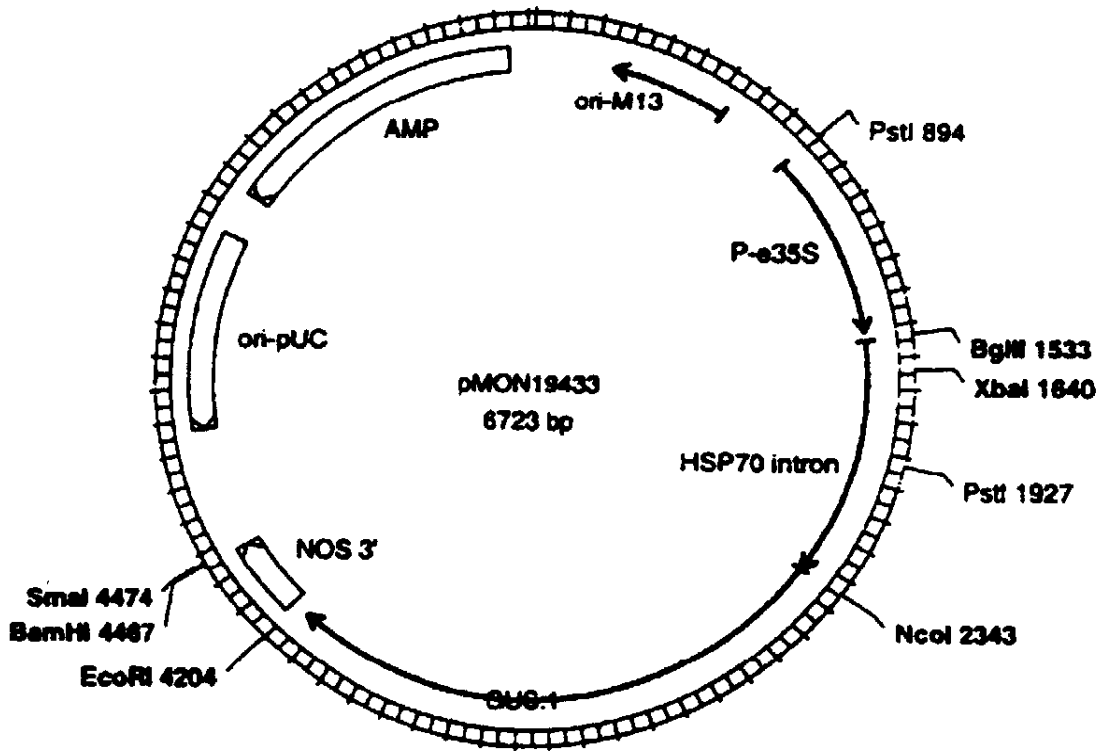
leader je vedouci sekvence

Obr. 3

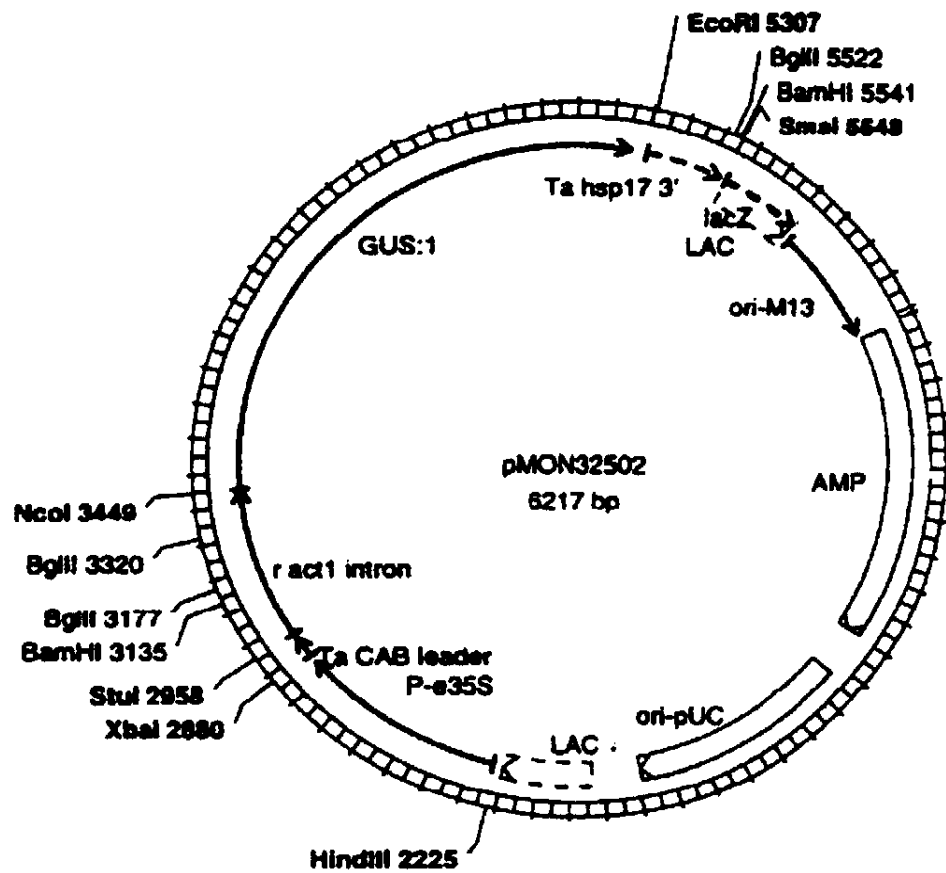


leader je vedouci sekvence

Obr. 4

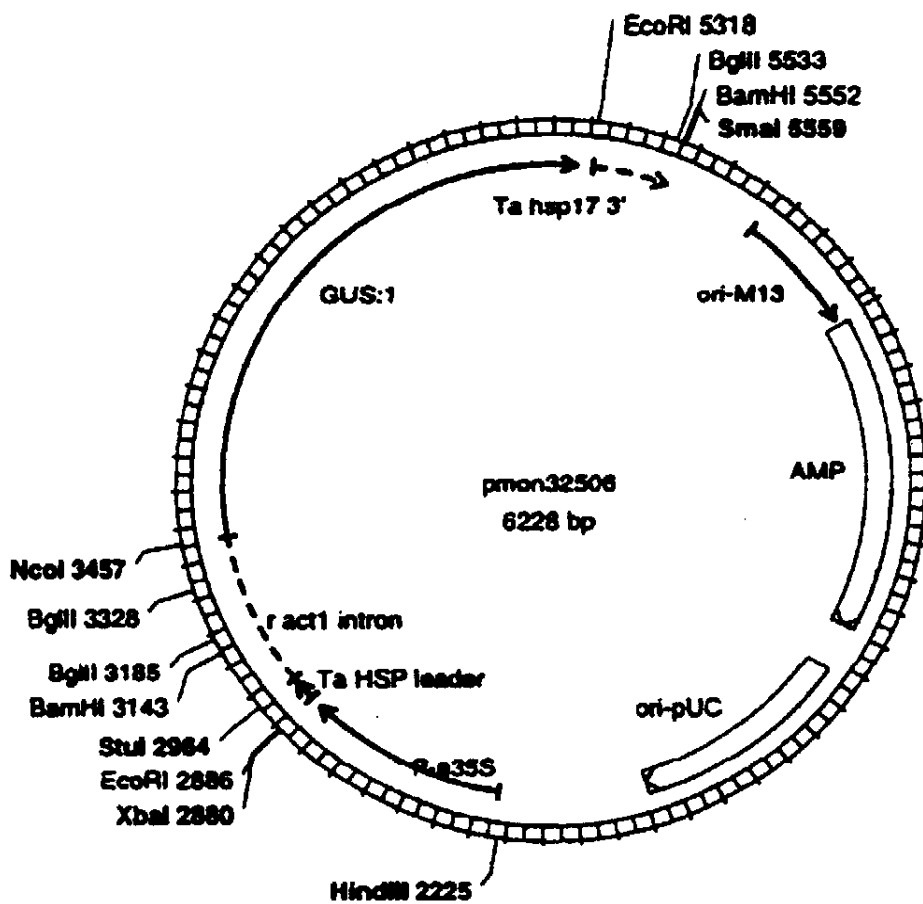


Obr. 5



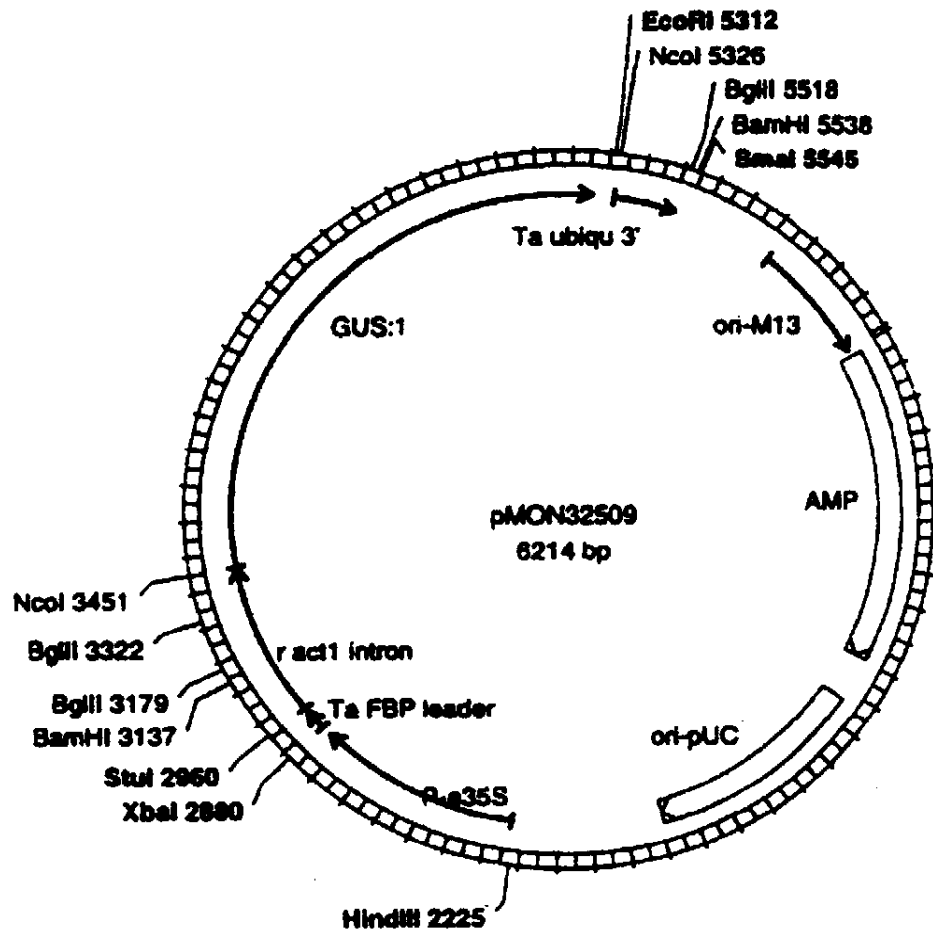
leader je vedoucí sekvence

Obr. 6



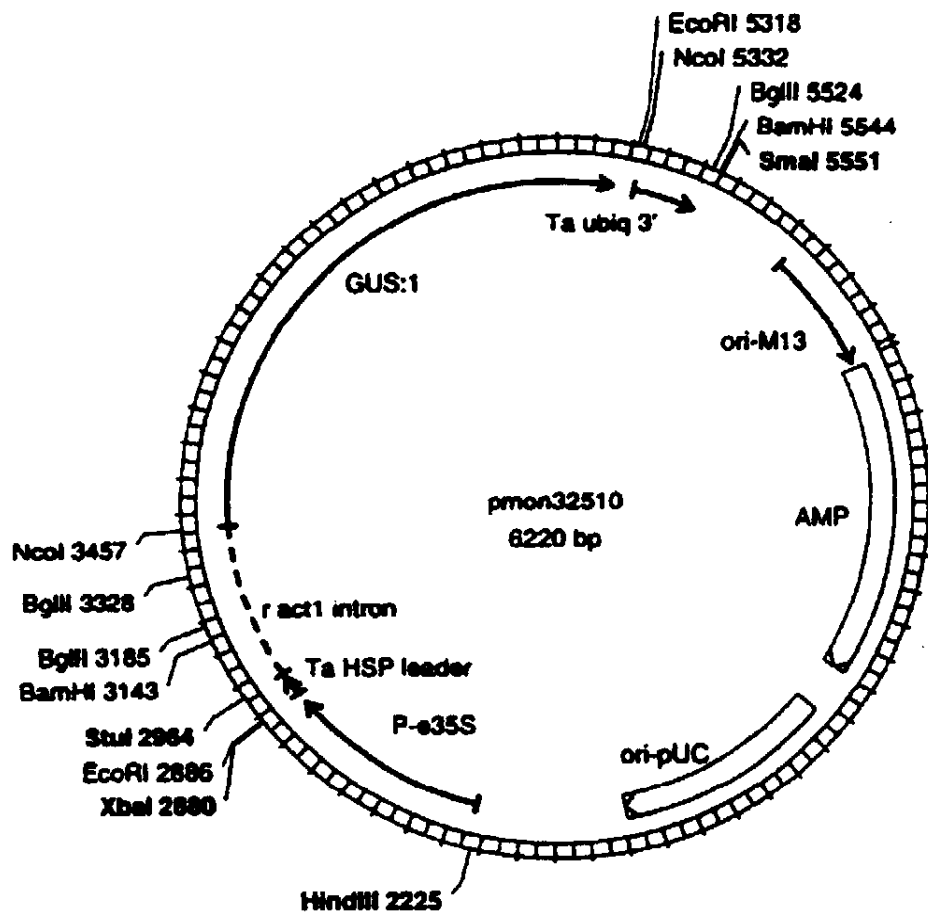
leader je vedoucí sekvence

Obr. 7



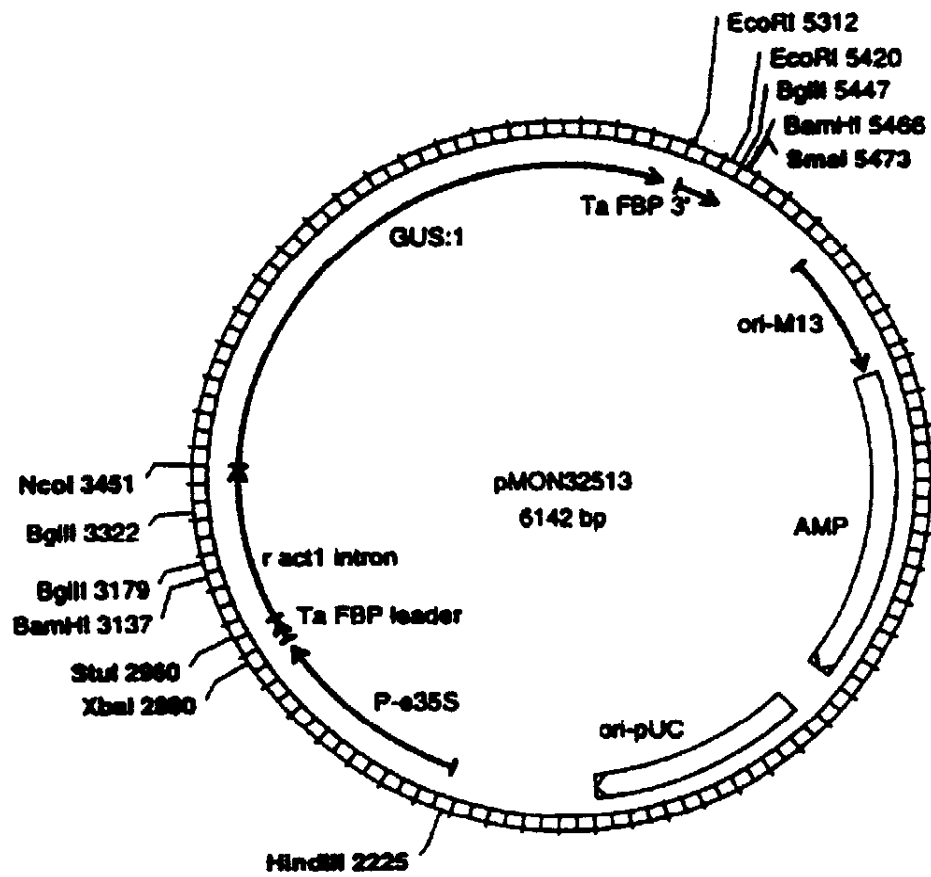
leader je vedoucí sekvence

Obr. 8



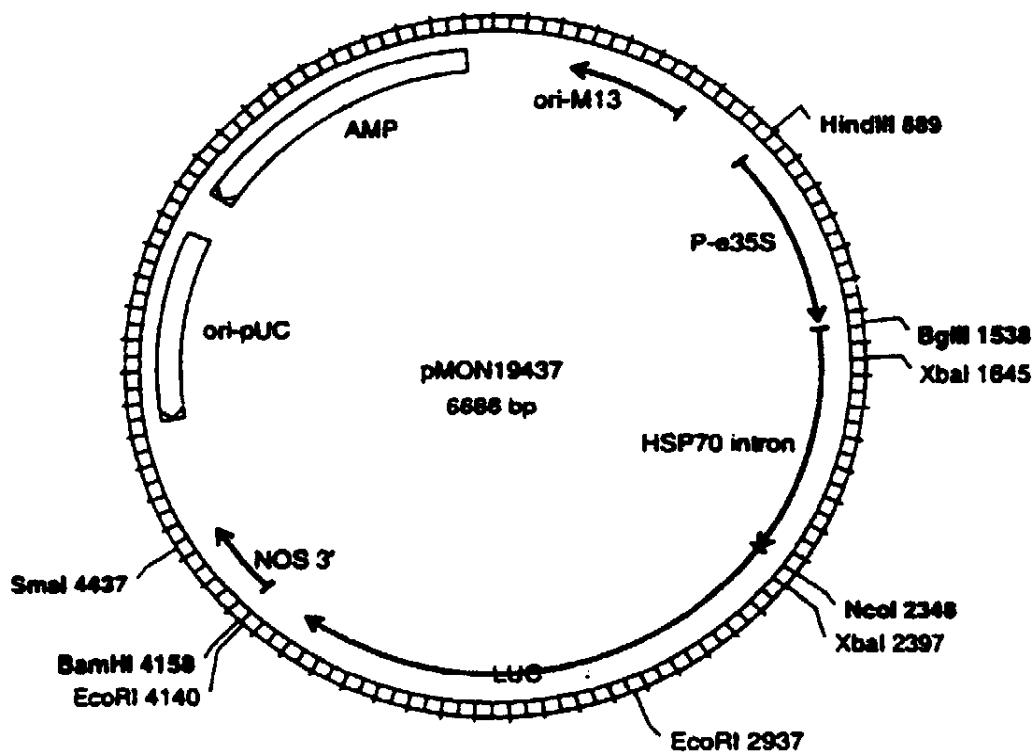
leader je vedoucí sekvence

Obr. 9

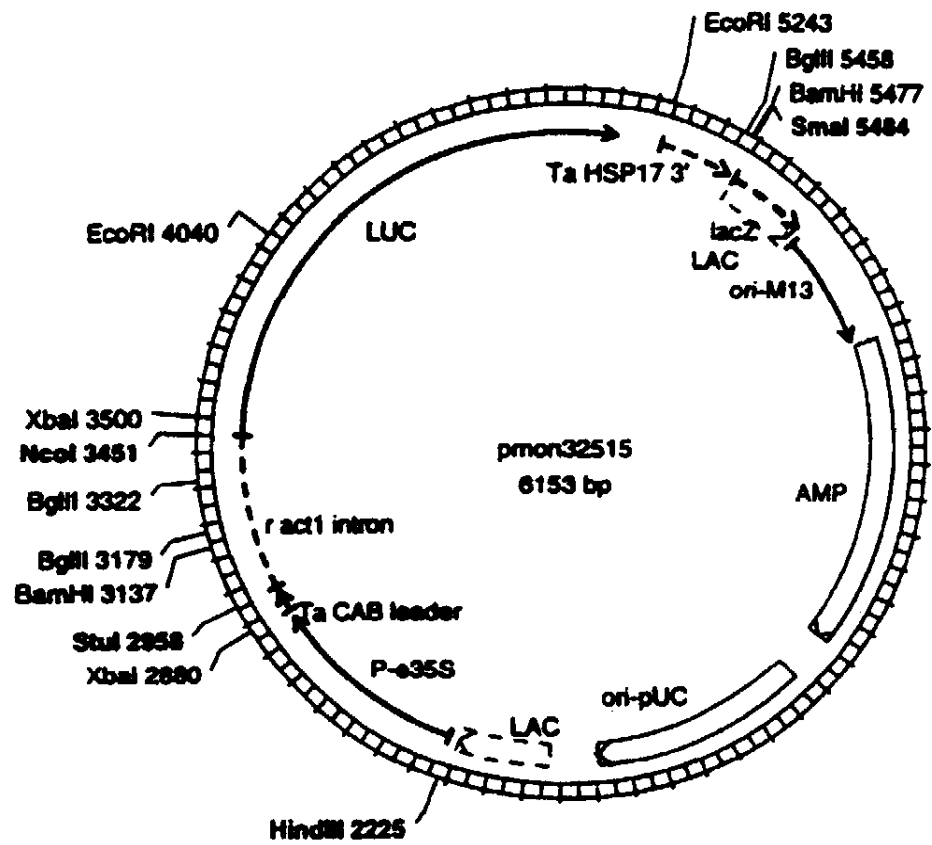


leader je vedouci sekvence

Obr. 10

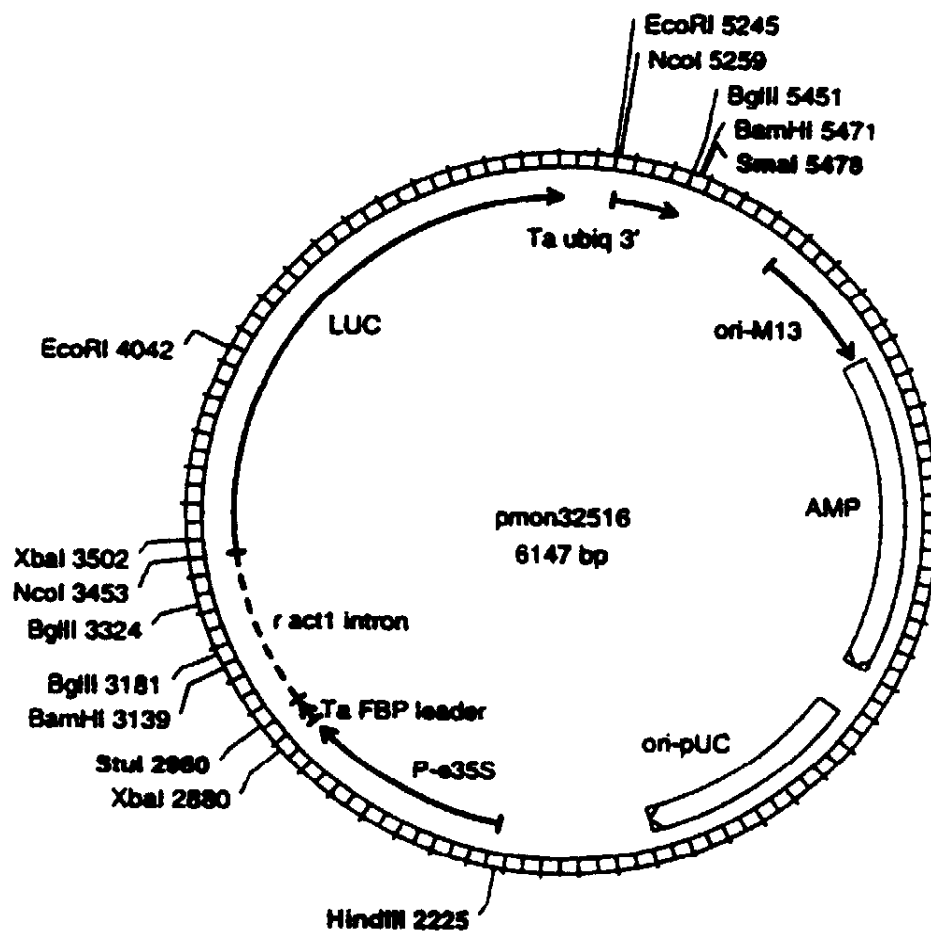


Obr. 11



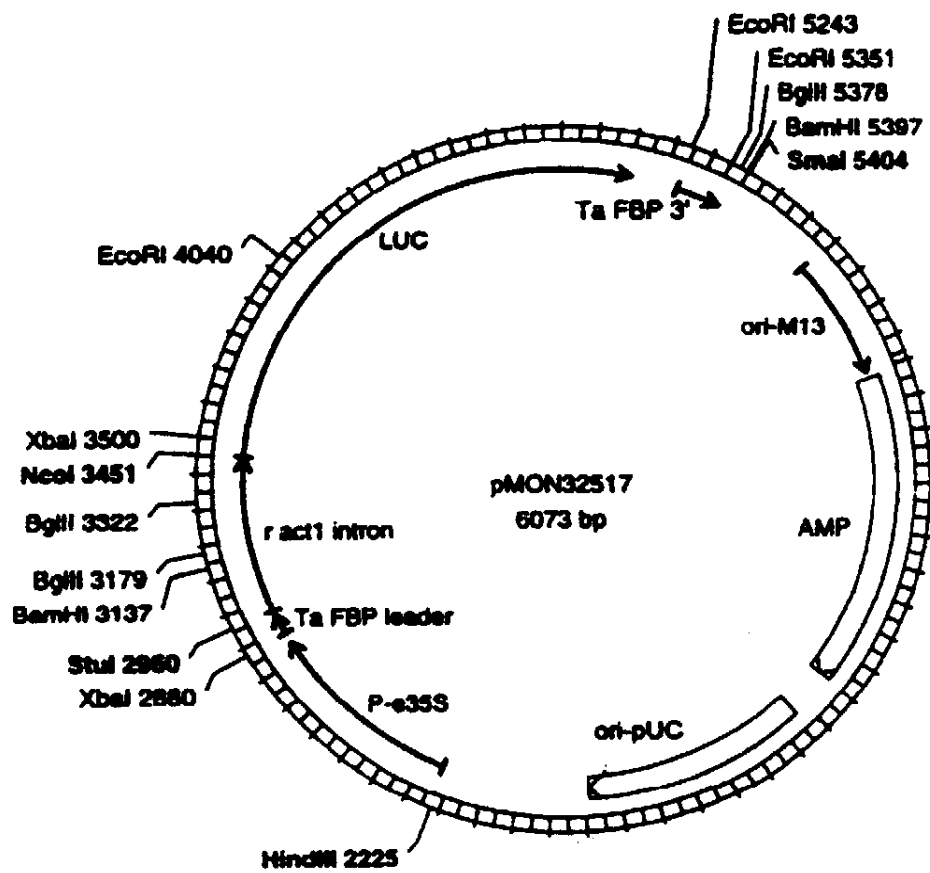
leader je vedoucí sekvence

Obr. 12



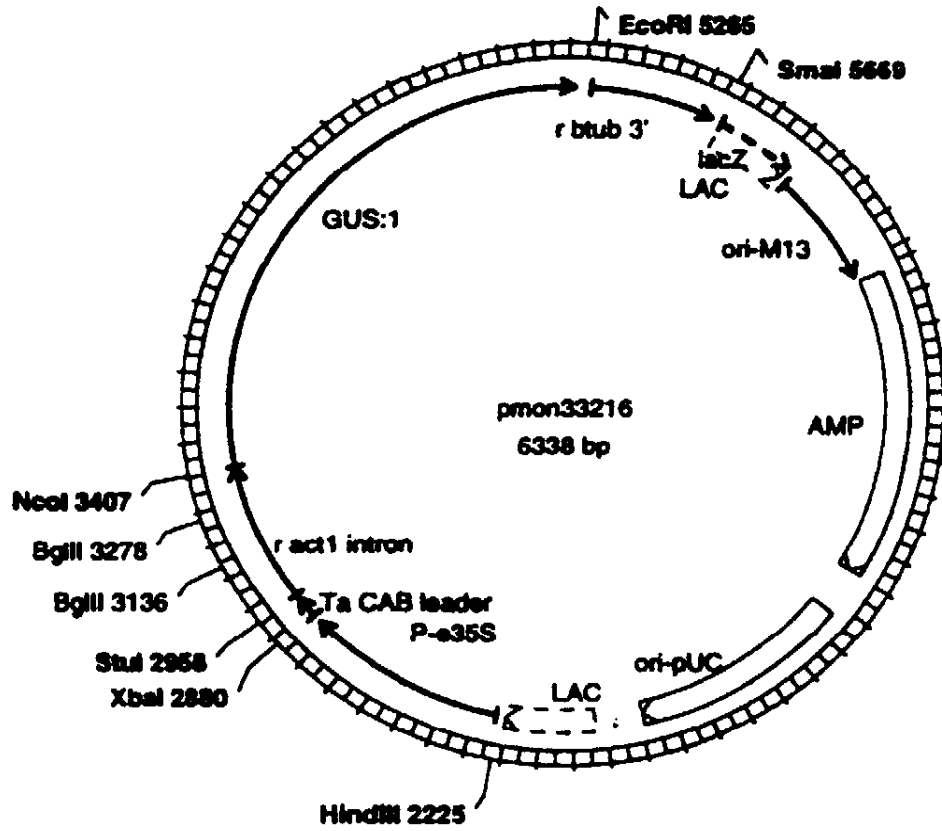
leader je vedouci sekvence

Obr. 13



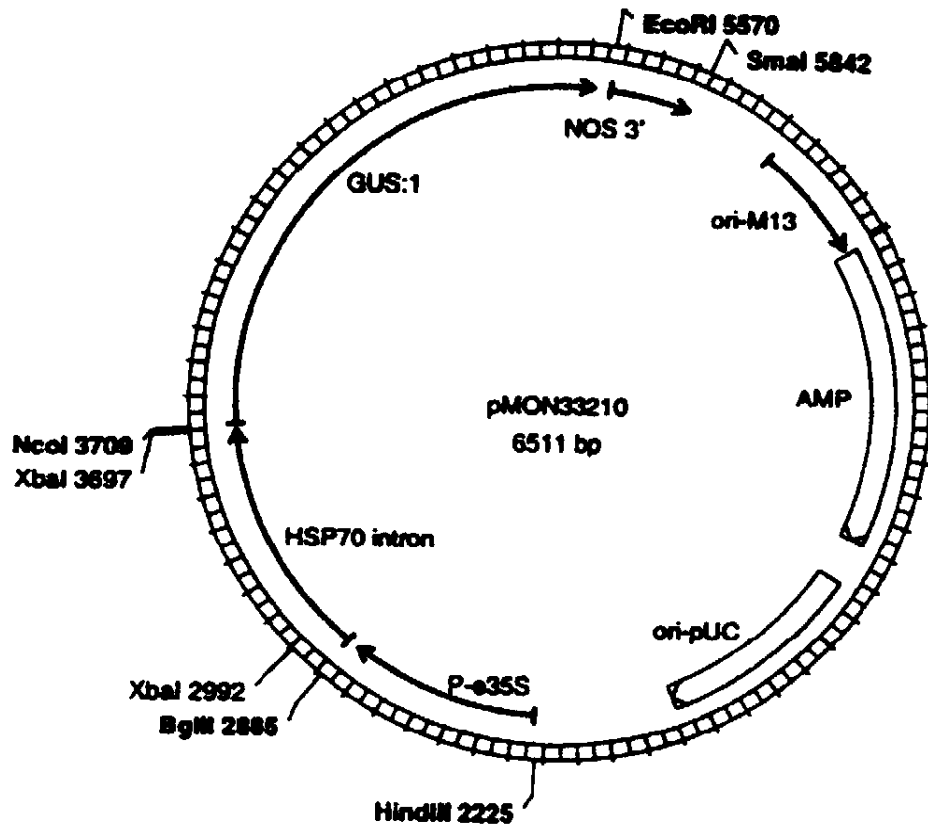
leader je vedouci sekvence

Obr. 14

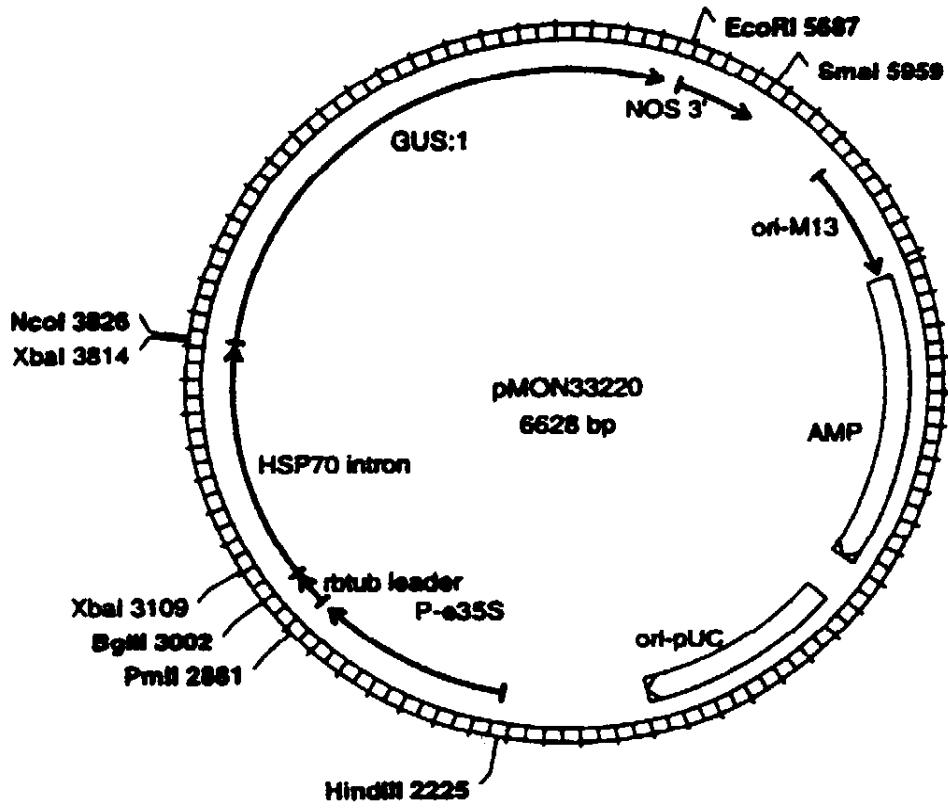


leader je vedoucí sekvence

Obr. 15

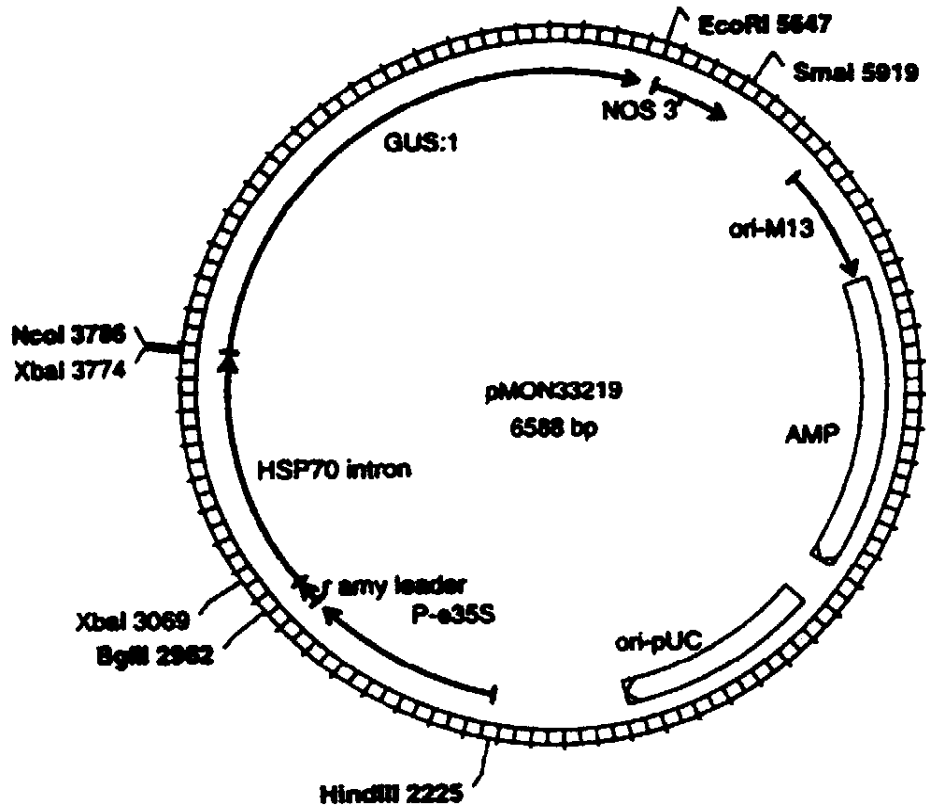


Obr. 16



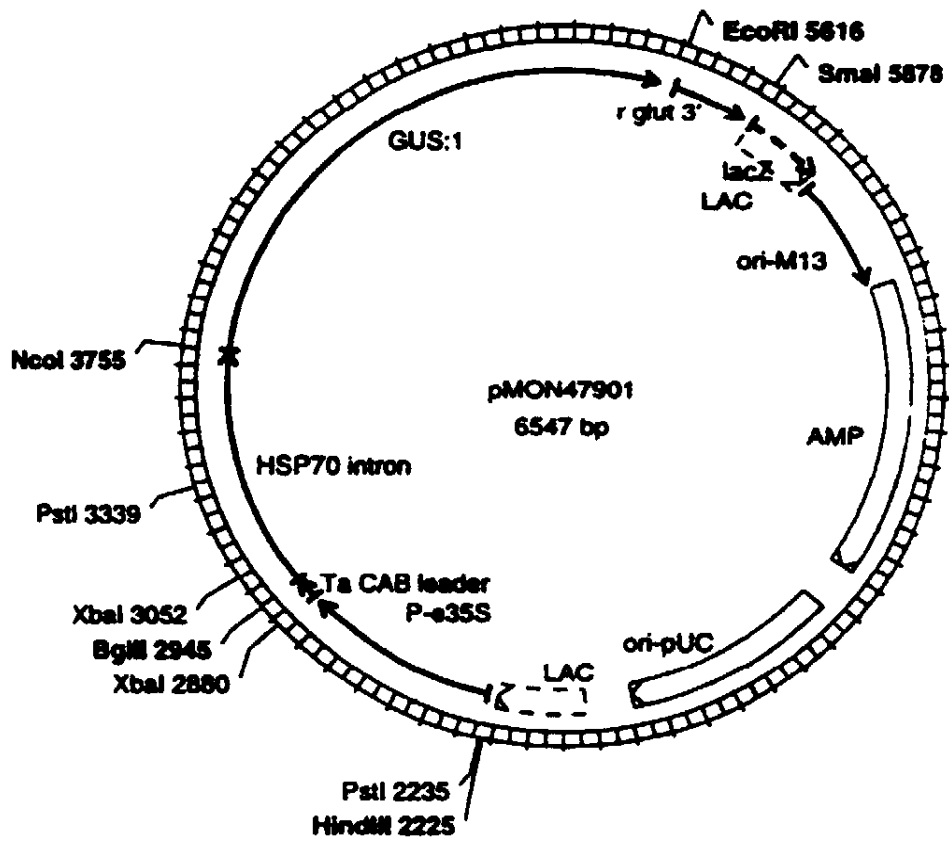
leader je vedoucí sekvence

Obr. 17



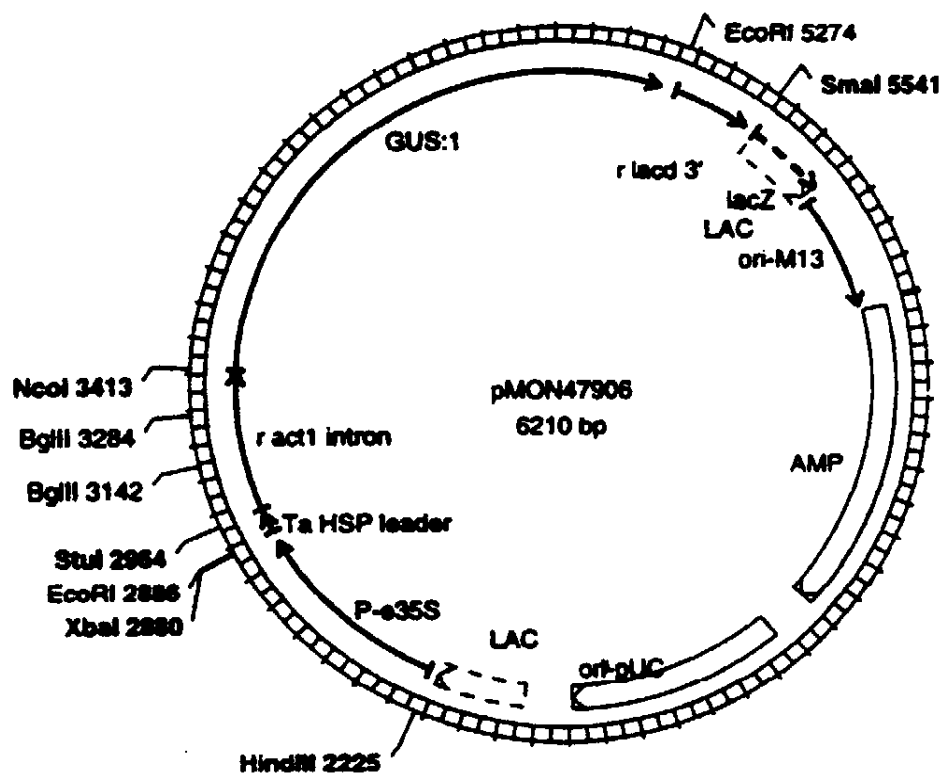
leader je vedoucí sekvence

Obr. 18



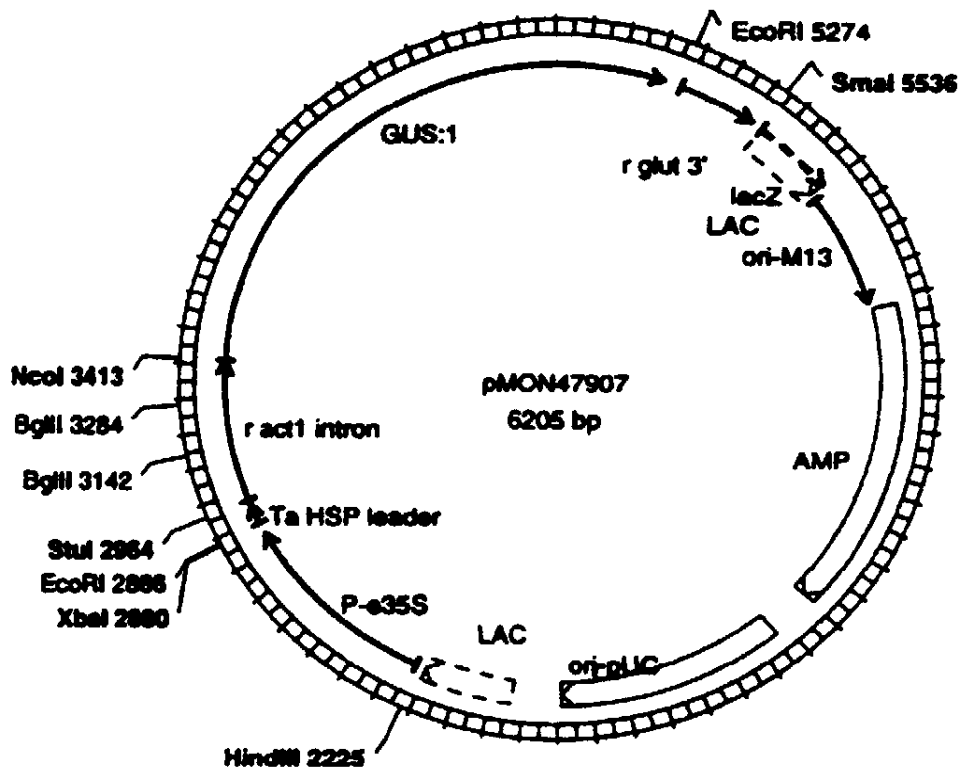
leader je vedouci sekvence

Obr. 19



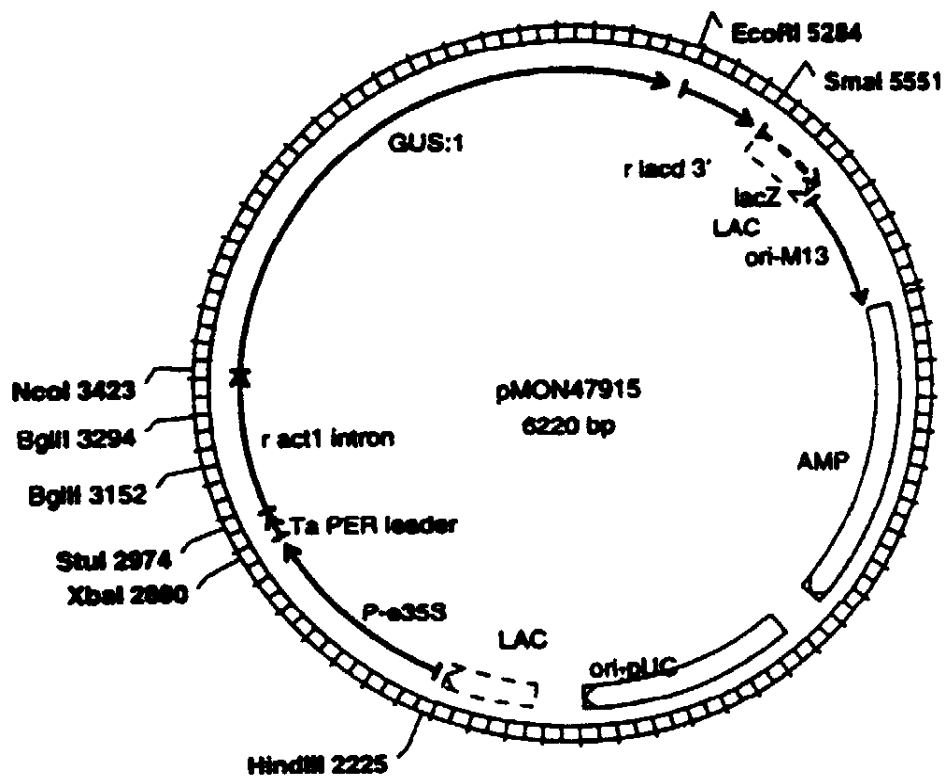
leader je vedoucí sekvence

Obr. 20



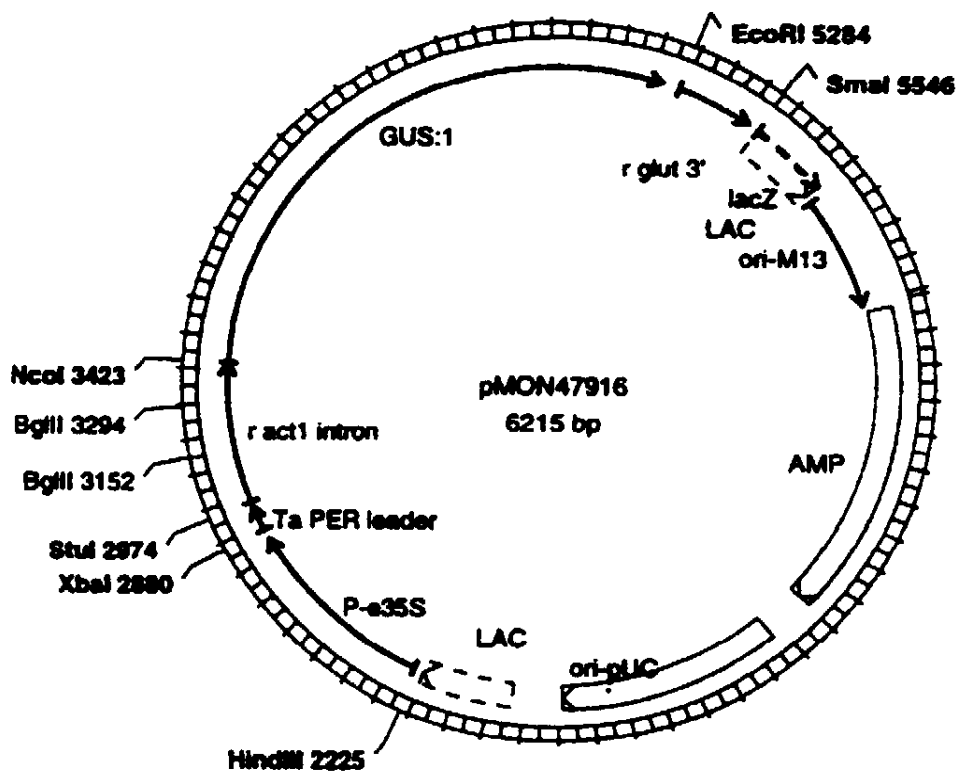
leader je vedoucí sekvence

Obr. 21



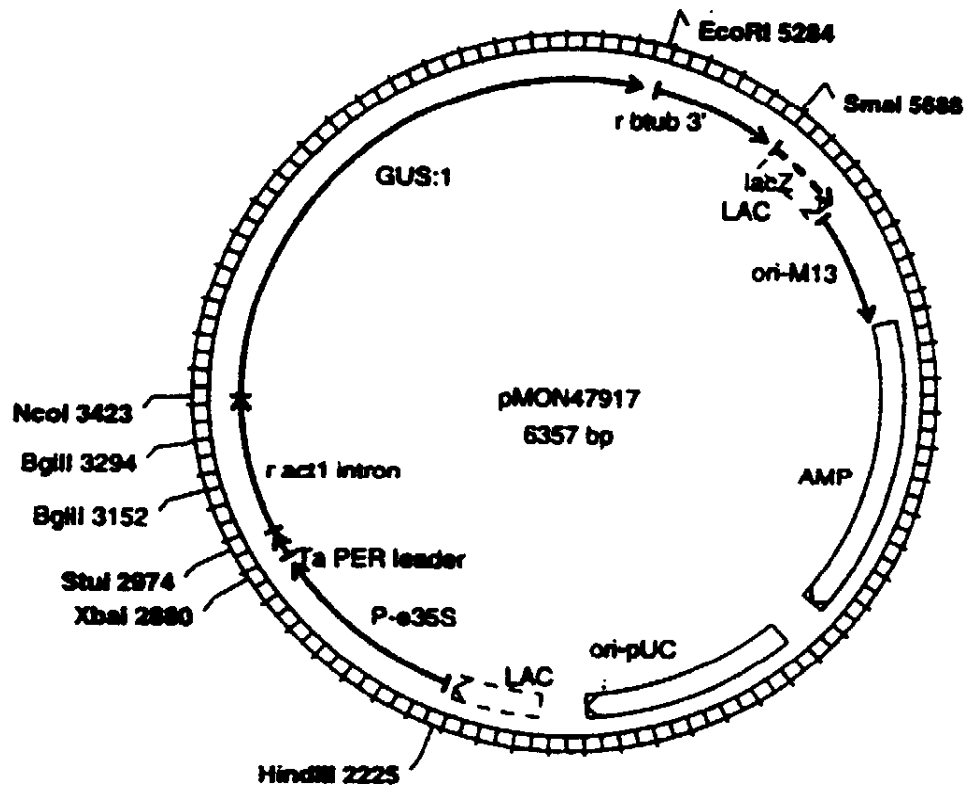
leader je vedoucí sekvence

Obr. 22



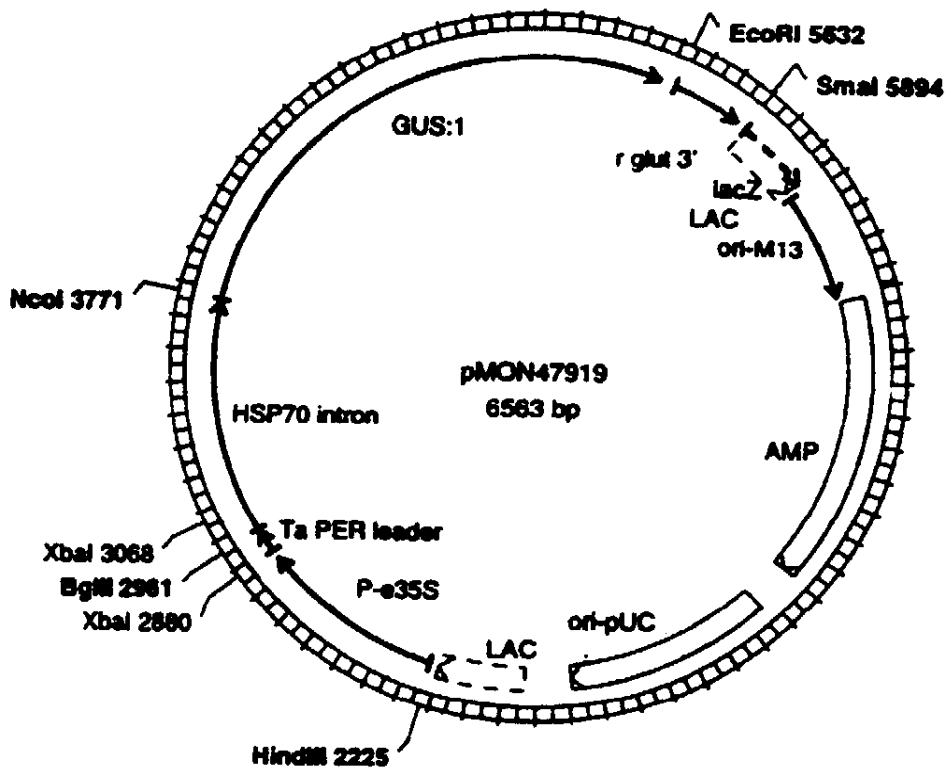
leader je vedoucí sekvence

Obr. 23



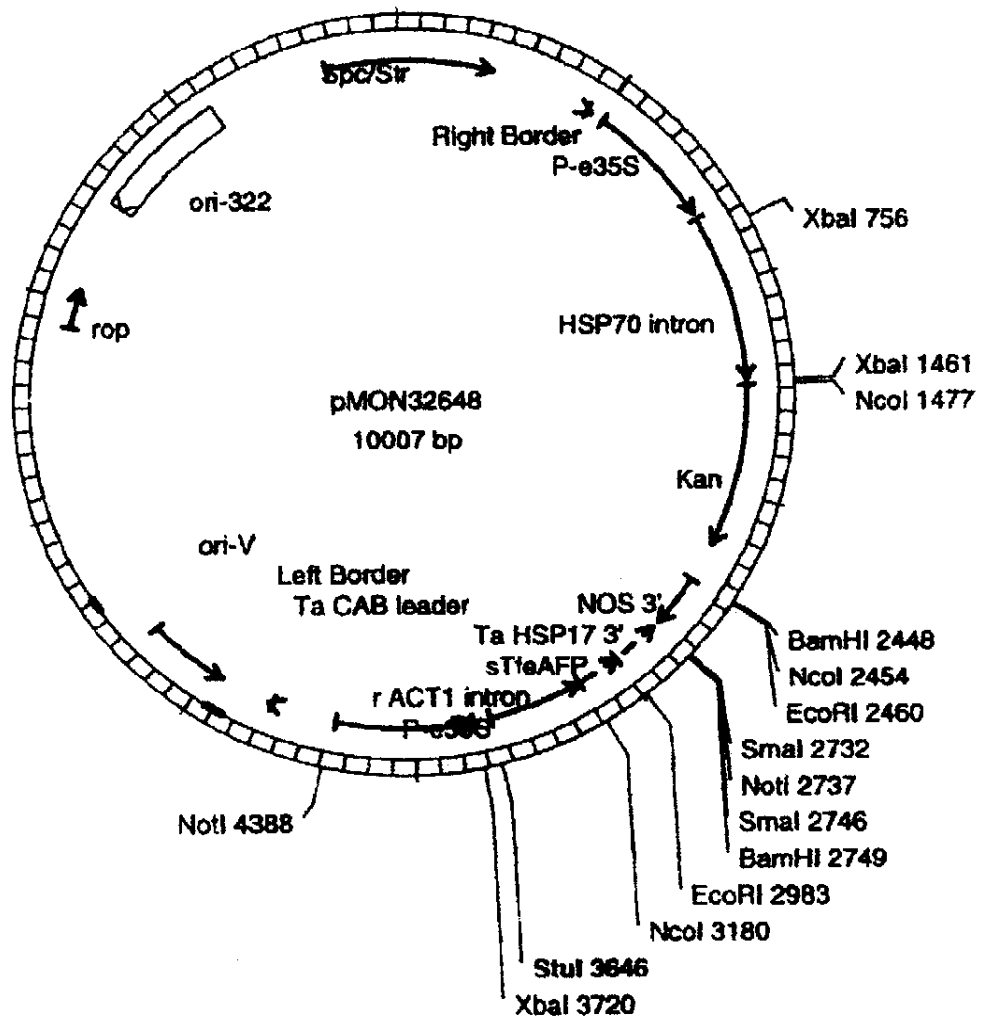
leader je vedoucí sekvence

Obr. 24



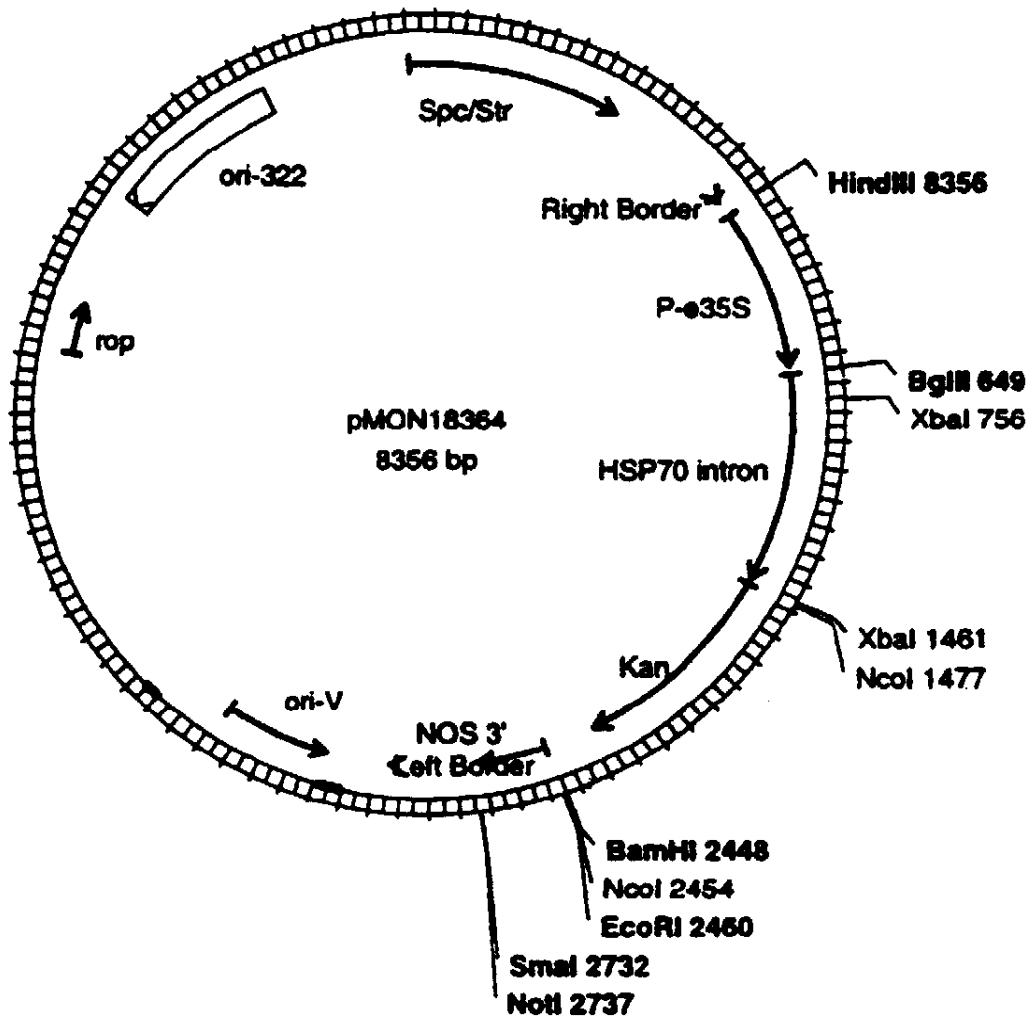
leader je vedoucí sekvence

Obr. 25



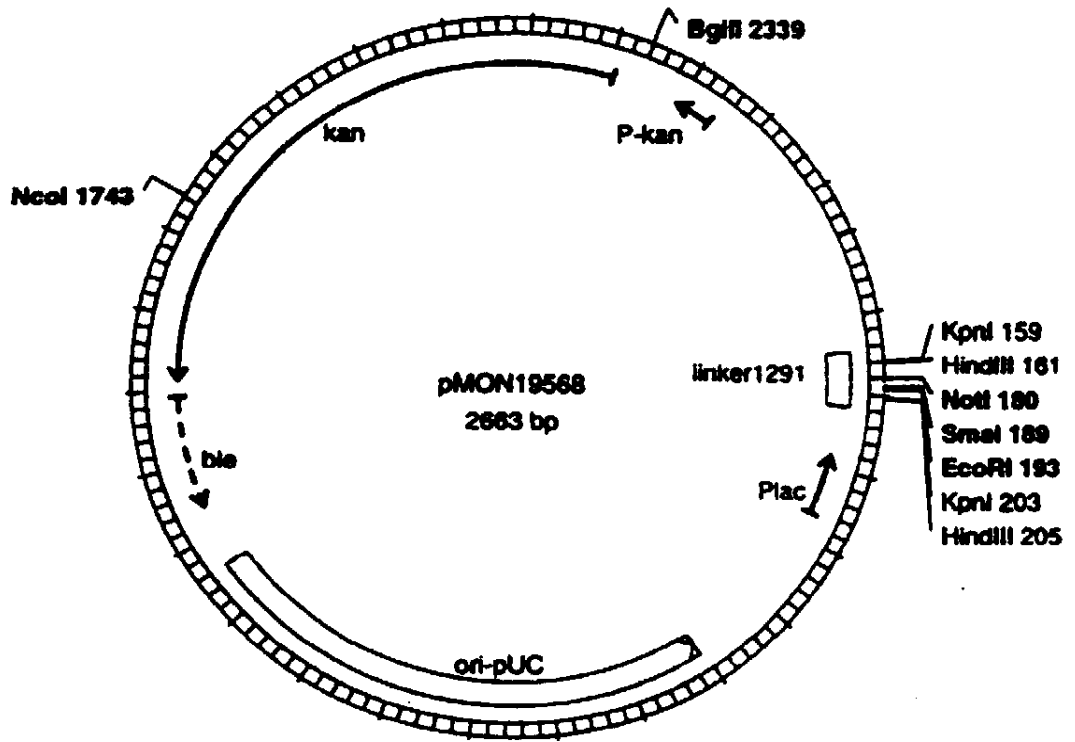
leader je vedoucí sekvence
 right border znamená pravé ohraničení
 left border znamená levé ohraničení

Obr. 26



right border znamená pravé ohraničení
 left border znamená levé ohraničení

Obr. 27



linker znamená spojovník

Obr. 28

Konec dokumentu
