

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

3890-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **28. 05. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.05.96, 11.09.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/19621588, 96/19636917**

(33) Země priority: **DE, DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 02. 99**
(Věstník č. 2/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/02793**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/45545**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/54
C 12 N	15/82
C 12 N	15/11
C 12 N	9/10
C 12 N	5/10
C 08 B	30/00
A 01 H	5/00
A 23 L	1/0522

(71) Přihlášovatel:

HOECHST SCHERING AGREVO GMBH,
Berlin, DE;

(72) Původce:

Block Martina, Hamburg, DE;
Lörz Horst, Hamburg, DE;
Lütticke Stephanie, Hamburg, DE;
Walter Lennart, Glückstadt, DE;
Frohberg Claus, Berlin, DE;
Kossmann Jens, Golm, DE;

(74) Zástupce:

Všetečka Miloš JUDr., Hálkova 2, Praha 2,
12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Molekuly nukleové kyseliny kódující
enzymy z pšenice účastníci se syntézy
škrobu**

(57) Anotace:

Molekuly nukleové kyseliny kódující enzymy,
které se účastní syntézy škrobu v rostlinách.
Tyto enzymy jsou syntázy škrobu z pšenice.
Vektory a hostitelské buňky, které obsahují
molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu,
zvláště pak transformovaných rostlinných
buněk a rostlin regenerovaných z takových
buněk, které mají zvýšenou nebo sníženou
aktivitu syntázy škrobu podle vynálezu.

CZ 3890-98 A3

Molekuly nukleové kyseliny kódující enzymy z pšenice účastní se syntézy škrobu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká molekul nukleové kyseliny kódující enzymy z pšenice, které se účastní syntézy škrobu v rostlinách. Tyto enzymy jsou izotypy syntázy škrobu.

Vynález se dále týká vektorů a bakterií, které obsahují takové molekuly nukleové kyseliny, a také rostlinných buněk a rostlin transformovaných popisovanými molekulami nukleové kyseliny.

Dále vynález popisuje způsoby přípravy transgenních rostlin, které díky integraci molekul DNA kódujících syntázu škrobu z pšenice syntetizují škrob s modifikovanými vlastnostmi.

Dosavadní stav techniky

Vzhledem k rostoucímu významu, který je připisován rostlinným látkám jako obnovitelnému zdroji surovin je jedním z předmětů biotechnologického výzkumu snaha o přizpůsobení rostlinných surovin požadavkům zpracovatelského průmyslu. Aby bylo možné využít modifikované obnovitelné suroviny v co nejvíce oblastech, je důležité získat široké spektrum látek.

~~Kromě olejů, tuků a proteinů tvoří základní obnovitelnou surovinu z rostlin polysacharidy. Kromě celulózy má významnou pozici mezi polysacharidy škrob, který je jednou z nejvýznamnějších zásobních látek u vyšších rostlin. Mezi nimi je zajímavou plodinu pšenice, neboť ta tvoří 20 % celkového množství škrobu produkovaného v Evropském společenství.~~

Polysacharid škrob je polymer tvořený chemicky homogenními základními složkami, a sice molekulami glukózy. Avšak tvoří vysoce složitou směs různých typů molekul, které se liší navzájem stupněm polymerace a stupněm větvení glukózových řetězců. Proto škrob není homogenní surovina. Rozlišuje se zejména amyložový škrob (dále jen amyloža), nevětvený polymer tvořený molekulami glukózy spojenými α -1,4-glykosidovou vazbou, a amylopektinový škrob (dále jen amylopektin), který je naopak složitou směsí různě rozvětvených glukózových řetězců. Větvení je výsledkem dodatečného vzájemného svázání řetězců α -1,6-glykosidovými vazbami. Škrob syntetizovaný v pšenici se skládá v závislosti na odrůdě přibližně z 11 až 37 % amyložy.

Pro co nejširší využití škrobu se zdá žádoucí, aby byly získány takové rostliny, které jsou schopné syntetizovat modifikovaný škrob, který je zvláště vhodný pro různá použití. Šlechtění je jedním ze způsobů, jak získat takové rostliny. To se ale v případě pšenice ukazuje být velmi obtížným vzhledem k polyploidním vlastnostem pěstovaných pšenic (jde o tetraploidní a hexaploidní rostliny). Teprve nedávno vědci uspěli ve vytvoření „voskovitých“ pšenic (bez obsahu amyložy) křížením mutantů existujících v přírodě (Nakamura et al., Mol. Gen. Genet. 248, 1995, 253-259). Jinou možností je specifická genetická modifikace metabolismu škrobu rostlin vytvářejících škrob technikami rekombinantní DNA. Avšak předpokladem toho je identifikovat a charakterizovat enzymy účastnící se syntézy škrobu a/nebo modifikace škrobu stejně tak jako izolovat příslušné molekuly DNA kódující tyto enzymy.

Biochemické metabolické dráhy vedoucí k tvorbě škrobu jsou v podstatě známy. Syntéza škrobu v rostlinné buňce probíhá v plastidech. Ve fotosynteticky aktivních pletivech to jsou

chloroplasty, ve fotosynteticky neaktivním, škrob hromadícím pletivu jsou to amyloplasty.

Nejdůležitějšími enzymy účastnicími se syntézy škrobu jsou syntázy škrobu a větvicí enzymy. V případě syntázy škrobu jsou popsány různé izotypy, které všechny katalyzují polymerizační reakci přenosu glykosylového rezidua z ADP-glukózy na α -1,4-glukany. Větvicí enzymy katalyzují počátek α -1,6 větvení lineárních α -1,4-glukanů.

Syntázy škrobu lze rozdělit do dvou skupin: syntázy škrobu vázané na zrna (GBSS, granule bound starch synthases) a rozpustné syntázy škrobu (SSS, soluble starch synthases). Toto odlišení však není vždy zřejmé, neboť některé syntázy škrobu jsou jak vázané na zrna, tak rozpustné (Denyer et al., Plant. J. 4, 1993, 191-198, Mu et al., Plant. J. 6, 1994, 151-159). V rámci této klasifikace jsou popisovány různé izotypy pro různé rostlinné druhy. Tyto izotypy se liší navzájem svou závislostí na molekule primeru (tzv. „na primeru závislé“, ty patří k typu II, a „na primeru nezávislé“, ty patří k typu I).

Dosud byla úspěšně určena přesná funkce v syntéze škrobu pouze pro izotyp GBSS I. Rostliny, ve kterých byla tato enzymová aktivita silně nebo úplně redukována, syntetizovaly škrob zcela bez amylozy (tzv. „voskovitý“ škrob) (Shure et al., Cell 35, 1983, 25-233, Visser et al., Mol. Gen. Genet. 225, 1991, 289-296, WO-92/11376), proto byla tomuto enzymu přisouzeny rozhodující role v syntéze amylozy. Tento jev lze také pozorovat v buňkách zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Delrue et al., J. Bacteriol. 174, 1992, 3612-3620). V případě *Chlamydomonas* bylo dále ukázáno, že BGSS I se nejen účastní syntézy amylozy, ale také ovlivňuje syntézu amylopektinu. U mutantů bez aktivity GBSS I chybí určitá frakce

za normálních okolností syntetizovaného amylopektinu, který má dlouhé řetězce glukánů.

Funkce dalších izotypů syntázy škrobu vázané na zrna, zvláště GBSS II, a také rozpustných syntáz škrobu, nejsou dosud zcela jasné. Předpokládá se, že rozpustné syntázy škrobu, společně s větvicími enzymy, se účastní syntézy amylopektinu (viz např. Ponstein et al., *Plant Physiol.* 92, 1990, 234-241), a že hrají důležitou roli v regulaci rychlosti syntézy škrobu.

V případě pšenice byly identifikovány na proteinové úrovni přinejmenším dva izotypy syntázy škrobu vázané na zrna (60 kDa a 100 až 105 kDa) a další izotyp, který zřejmě představuje rozpustnou syntázu škrobu (Denyer et al., *Planta* 196, 1995, 256-265, Rahman et al., *Aust. J. Plant. Physiol.* 22, 1995, 793-803). Existence několika izotypů SSS byly již prokázána chromatografickými metodami (Rijven, *Plant Physiol.* 81, 1986, 448-453). Také cDNA kódující GBSS I z pšenice byly již popsána (Ainsworth et al., *Plant Mol. Biol.* 22, 1993, 67-82).

Sekvence nukleových kyselin kódující další izotypy syntázy škrobu z pšenice jsou dosud neznámé.

Sekvence cDNA kódující jiné syntázy škrobu než GBSS I byly dosud popsány pouze u hrachu (Dry et al., *Plant. J.* 2, 1992, 193-202), rýže (Baba et al., *Plant Physiol.* 103, 1993, 565-573) a bramboru (Edwards et al., *Plant. J.* 8, 1995, 283-294).

Rozpustné syntázy škrobu byly identifikovány pro několik dalších rostlin druhů kromě pšenice. Tak např. rozpustné syntázy škrobu byly izolovány v homogenní formě např. z hrachu (Denyer a Smith, *Planta* 186, 1992, 609-617) a bramboru (Edwards et al., *Plant J.* 8, 1995, 283-294). V těchto případech se zjistilo, že izotyp rozpustné syntázy škrobu identi-

fikovaný jako SSS II je shodný se syntázou škrobu vázanou na zrna GBSS II (Denyer et al., Plant J. 4, 1993, 191-198, Edwards et al., Plant J. 8, 1995, 283-294). V případě dalších rostlinných druhů byla existence několika izotypů SSS popsána pomocí chromatografických metod, jako např. v případě ječmene (Tyynela a Schulman, Physiologia Plantarum 89, 1993, 835-841, Kreis, Planta 148, 1980, 412-416). Avšak doposud nebyly popsány sekvence DNA kódující tyto proteiny. Je třeba identifikovat příslušné sekvence DNA kódující další izotypy syntázy škrobu, aby bylo možné modifikovat jakoukoliv požadovanou rostlinu ukládající škrob, zejména pak pšenici, takovým způsobem, aby syntetizovala modifikovaný škrob.

Proto je předmětem předkládaného vynálezu poskytnout molekuly nukleové kyseliny kódující tento enzym, zejména enzym z pšenice, účastnící se biosyntézy škrobu, jejichž pomocí lze připravit geneticky modifikované rostliny, které mají zvýšenou nebo sníženou aktivitu těchto enzymů, a tím podnítit modifikaci chemických a/nebo fyzikálních vlastností škrobu syntetizovaného v těchto rostlinách. Tento cíl byl dosažen poskytnutím provedení vynálezu popsaných v nárocích.

Podstata vynálezu

První aspekt vynálezu se týká molekul nukleové kyseliny kódujících proteiny z pšenice s biologickou aktivitou rozpustné syntázy škrobu, přičemž tyto molekuly výhodně kódují proteiny obsahující sekvenci aminokyselin uvedenou zde jako sekvenci identifikačního čísla (i. č.) 2. Vynález se zvláště týká molekul nukleové kyseliny obsahujících buď celou nebo část nukleotidové sekvence uvedené zde jako sekvence i. č. 1, výhodně molekuly, které obsahují kódující úsek sekvence

i. č. 1 nebo, což je možný případ, odpovídajících ribonukleotidových sekvencí.

Předkládaný vynález se dále týká molekul nukleové kyseliny, které kódují rozpustnou syntázu škrobu z pšenice a hybridizují s jednou z výše uvedených molekul.

Molekuly nukleové kyseliny kódující rozpustnou syntázu škrobu z pšenice a sekvence, která se liší od výše zmíněné sekvence vzhledem k degeneraci genetického kódu, jsou také předmětem předkládaného vynálezu.

Vynález se také týká molekul nukleové kyseliny se sekvencí, která je komplementární k celé nebo k části výše uvedených sekvencí.

Proteiny kódované výše popsanými molekulami nukleové kyseliny jsou rozpustné syntázy škrobu odvozené z pšenice. Tyto proteiny mají určité úseky homologické s dosud známými rozpustnými syntázami škrobu z jiných rostlinných druhů.

Další aspekt předkládaného vynálezu se týká molekul nukleové kyseliny kódujících proteiny s biologickou aktivitou syntázy škrobu z pšenice, přičemž tyto molekuly výhodně kódují proteiny obsahující sekvenci aminokyselin uvedenou zde jako sekvenci i. č. 6. Vynález se zvláště týká molekul nukleové kyseliny obsahujících nukleotidovou sekvenci uvedenou zde jako sekvenci i. č. 5 nebo její část, výhodně obsahujících kódující úsek uvedený v sekvenci i. č. 5, anebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci.

Předkládaný vynález se dále týká molekul nukleové kyseliny kódujících syntázu škrobu z pšenice a hybridizující s některou z výše uvedených molekul.

Molekuly nukleové kyseliny, které kódují syntázu škrobu z pšenice, a které se liší od výše uvedených sekvencí nukle-

ové kyseliny díky degeneraci genetického kódu, jsou také předmětem předkládaného vynálezu.

Vynález se také týká molekul nukleové kyseliny, které mají sekvenci komplementární k celé nebo části některé z výše zmíněných sekvencí.

Protein kódovaný výše uvedenými molekulami nukleové kyseliny je protein s biologickou aktivitou syntázy škrobu z pšenice. Když se srovnala homologie s dalšími známými sekvencemi, zjistilo se, že homologie nejvyššího stupně je se sekvencí hrachu, která kóduje syntázu škrobu vázanou na zrna. Takže se předpokládá, že popsaná sekvence nukleové kyseliny kóduje syntázu škrobu vázanou na zrna z pšenice.

Molekuly DNA podle předkládaného vynálezu mohou být DNA stejně tak jako RNA. Odpovídající molekuly DNA jsou např. molekuly genomové DNA nebo cDNA. Molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu je možné izolovat z přírodních zdrojů nebo mohou být syntetizovány odborníky známými metodami.

V této přihlášce termín „hybridizace“ znamená hybridizaci v obvyklých konvenčních podmínkách, výhodně v stringentních (přísných) podmínkách, jak popisuje např. Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Molekuly nukleové kyseliny hybridizující s molekulami podle vynálezu se mohou izolovat např. z knihoven genomové DNA nebo cDNA připravených z pletiva pšenice.

Tudíž identifikace a izolace takových molekul nukleové kyseliny se může uskutečnit pomocí použitím molekul podle vynálezu nebo jejich částí, nebo případně reverzních komplemen-

tárních řetězců těchto molekul, např. hybridizací standardním způsobem (viz Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Jako sonda pro hybridizaci se mohou použít např. molekuly nukleové kyseliny, které buď přesně nebo jako základ obsahují nukleotidové sekvence uvedené zde jako sekvence i. č. 1 nebo i. č. 5, nebo jejich části. Fragmenty použité jako sondy pro hybridizaci také mohou být syntetické fragmenty, které byly připraveny konvenčním metodami a sekvence, které jsou v základu identické s molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu. Po té, co byly identifikovány a izolovány geny hybridizující se sekvencemi nukleové kyseliny podle vynálezu, je třeba sekvence určit a analyzovat vlastnosti proteinů, které jsou sekvencemi kódovány.

Molekuly hybridizující s molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu také obsahují fragmenty, deriváty a alelické varianty výše popsaných molekuly nukleové kyseliny, které kódují protein z pšenice popsaný ve vynálezu. Tím jsou fragmenty definovány jako části molekul nukleové kyseliny, které jsou dostatečně dlouhé k tomu, aby kódovaly jeden z popsaných proteinů. To zahrnuje také části molekul nukleové kyseliny podle vynálezu, které postrádají nukleotidovou sekvenci kódující signální peptid zodpovědný za translokaci proteinu

do plastidu. Takové fragmenty jsou např. nukleotidové sekvence kódující zbytky aminokyselin 34 až 671 uvedená zde jako sekvence i. č. 2, nebo nukleotidová sekvence kódující zbytky aminokyselin 58 až 799 nebo 61 až 799 v sekvenci i. č. 6. Fragmenty, které jsou zvláště výhodné podle předkládaného vynálezu, jsou fragmenty obsahující nukleotidy 186 až 2239 v sekvenci i. č. 1 a také fragmenty obsahující dodatečný zbytek G na 5'-konci, a fragmenty obsahující nukleoti-

dy 1084 až 2825 sekvence i. č. 2. V tomto kontextu termín „deriváty“ znamená, že sekvence takových molekul se liší od sekvencí výše uvedených molekul nukleové kyseliny v jedné nebo více polohách, a že tyto sekvence vykazují vysoký stupeň homologie s uvedenými sekvencemi. Tedy homologie znamená alespoň 40% identitu sekvencí, zvláště identitu alespoň 60%, výhodně vyšší než 80 % a ještě výhodnější identitu sekvencí vyšší než 90 %. Odchytky, které se objeví při srovnání s výše uvedenými molekulami nukleové kyseliny mohou být způsobeny delecí, substitucí, inzercí nebo rekombinací.

Kromě toho homologie znamená, že existuje také funkční a/nebo strukturní shoda mezi příslušnými molekulami nebo proteiny, které kódují. Molekuly nukleové kyseliny, které jsou homologní s výše popsanými molekulami a představují deriváty těchto molekul, jsou všeobecně variacemi těchto molekul, které tvoří modifikace vykazující shodnou biologickou funkci. Tyto variace mohou být přirozeně se vyskytující variace, např. sekvence pocházející z jiného organismu, nebo mutace, ať už vzniklé přirozeně nebo zavedené prostřednictvím specifické mutagenese. Kromě toho variace mohou být synteticky připravené sekvence. Alelické varianty mohou být přirozeně se vyskytující stejně jako synteticky připravené varianty nebo varianty připravené technikami rekombinantní DNA.

~~Proteiny kódované různými variantami molekul nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu vykazují jisté společné charakteristiky. Patří sem enzymová aktivita, molekulová hmotnost, imunologická reaktivita, konformace apod., a také fyzikální vlastnosti jako je pohyblivost v gelové elektrofořeze, chromatografické charakteristiky, sedimentační koeficient, rozpustnost, spektroskopické vlastnosti, stabilita, pH-optimum, teplotní optimum apod. Význačnými charakteristi-~~

kami syntázy škrobu jsou: I) lokalizace ve stromatu plastidu v rostlinné buňce, II) schopnost syntetizovat lineární α -1,4 spojené polyglukany užitím ADP-glukózy jako substrátu. Tato aktivita může být určena postupem který popsali Denyer a Smith (Planta 186, 1992, 606-617) nebo postupem uvedeným v příkladech.

Molekuly nukleové kyseliny specificky hybridizující s řetězcem molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu jsou také předmětem vynálezu. Jsou to výhodně oligonukleotidy délky alespoň 10, zvláště alespoň 15 a výhodněji délky alespoň 50 nukleotidů. Tyto molekuly nukleové kyseliny specificky hybridizují s řetězcem molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu, tj. nehybridizují, nebo hybridizují pouze v malém rozsahu, se sekvencemi nukleové kyseliny kódujícími jiné proteiny, zvláště jiné syntázy škrobu. Oligonukleotidy podle vynálezu se mohou použít např. jako primery pro PCR reakci. Také mohou být komponentou anti-sense konstruktů (s orientací proti smyslu transkripce) nebo molekul DNA kódujících vhodné ribozymy.

Dále se vynález týká vektorů, zvláště plazmidů, kozmidů, virů, bakteriofágů a dalších vektorů, které se užívají v genomovém inženýrství, a které obsahují molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu.

Ve výhodném provedení vynálezu jsou molekuly nukleové kyseliny obsažené ve vektorech spojeny s regulačními prvky, které zajišťují transkripci a syntézu translatovatelné RNA v prokaryotických i eukaryotických buňkách.

Expresí molekul nukleové kyseliny podle vynálezu v prokaryotických buňkách jako např. v *Escherichia coli* je zajímavá

proto, že umožňuje pečlivější charakterizaci enzymatických aktivit enzymů kódovaných těmito molekulami. Konkrétně je možné charakterizovat produkt syntetizovaný příslušným enzymem v nepřítomnosti ostatních enzymů, které se účastní syntézy škrobu v rostlinné buňce. To umožňuje činit závěry o funkci, kterou má příslušný protein v průběhu syntézy škrobu v rostlinné buňce.

Navíc je možné do molekul nukleové kyseliny podle vynálezu vnést různé mutace pomocí konvenčních technik molekulární biologie (viz např. Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), čímž se indukují syntéza proteinů s možností modifikovaných biologických vlastností. Tímto způsobem je na jedné straně možné vytvořit deleční mutanty, kde se vytvářejí molekuly nukleové kyseliny postupnými delecemi na 5'-konci nebo 3'-konci kódující sekvence DNA. Takové molekuly nukleové kyseliny pak mohou vést k syntéze odpovídajícím způsobem zkrácených proteinů. Tak např. delece na 5'-konci nukleotidové sekvence umožňuje identifikovat sekvence aminokyselin, které jsou zodpovědné za translokaci enzymu do plastidů (tranzitní peptidy). To umožňuje specifickou přípravu enzymů, které díky odstranění příslušných sekvencí nejsou již dále lokalizovány v plastidech ale v cytosolu, nebo které díky připojení další signální sekvence jsou lokalizovány v jiných kompartmentech.

Na druhé straně bodové mutace mohou být také zavedeny v takových polohách, kde modifikace aminokyseliny ovlivňuje např. enzymovou aktivitu nebo regulaci enzymu. Tímto způsobem se mohou vytvořit např. mutanty s modifikovanou hodnotou K_m , nebo mutanty, které nejsou již dále ovlivňovány regulač-

ním mechanismem allosterické regulace nebo kovalentní modifikace obvykle se vyskytující v buňce.

Navíc se mohou vytvořit mutanty vykazující odlišnou substrátovou nebo produktovou specifickou jako např. mutanty, které užívají jako substrát ADP-glukózo-6-fosfát místo ADP-glukózy. Také mohou být vytvořeny mutanty s modifikovaným teplotním profilem aktivity.

Pro genové manipulace v prokaryotických buňkách molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu nebo jejich části mohou být vloženy do plazmidů, které umožňují mutagenezi nebo modifikaci sekvencí rekombinací sekvencí DNA. Pomocí standardních metod (viz např. Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) je možné provést výměnu baze nebo se mohou přidat přirozené nebo syntetické sekvence. Pro spojení fragmentů DNA se mohou k fragmentům připojit adaptory nebo linkery. Mohou se využít takové manipulace, které nabízejí vhodná restrikční místa nebo které odstraňují postradatelnou DNA nebo restrikční místa. Kdekoliv je to užitečné je možné použít inzertů, delecí nebo substitucí, *in vitro* mutageneze, techniky „primer repair“ (opravy primeru), restrikce nebo ligace. K analýze se pak obvykle užívá sekvenční analýza, restrikční analýza a další biochemické a molekulárně-biologické metody.

Další provedení předkládaného vynálezu se týká hostitelských buněk, zvláště prokaryotických nebo eukaryotických buněk, které byly transformovány a/nebo geneticky modifikovány pomocí molekul nukleové kyseliny uvedených v předchozím textu nebo vektoru podle vynálezu, a také se týká buněk pocházejících z takto transformovaných a/nebo geneticky modifikovaných buněk obsahujících molekulu nukleové kyseliny podle vy-

nálezu nebo vektor podle vynálezu. Výhodně se jedná o bakteriální nebo rostlinnou buňku. Taková buňka je charakteristická tím, že vnesená molekula nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu je buďto heterologní vzhledem k transformované buňce, tj. přirozeně se v této buňce nevyskytuje, nebo je umístěna v genomu na jiném místě než odpovídající přirozeně se vyskytující sekvence.

Předmětem vynálezu jsou dále proteiny kódované molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu a také způsob jejich přípravy, kdy se hostitelská buňka podle vynálezu kultivuje v podmínkách, které umožňují syntézu proteinu a protein se pak izoluje z kultivovaných buněk a/nebo kultivačního média.

Dále se předkládaný vynález týká transgenních rostlinných buněk transformovaných jednou nebo více molekulami nukleové kyseliny podle vynálezu. Takové buňky obsahují jednu nebo více molekul nukleové kyseliny podle vynálezu, které jsou výhodně spojeny s regulačními prvky DNA, zejména se jedná o promotor, které zajišťují transkripci v rostlinné buňce. Takové buňky se liší od přirozeně se vyskytujících rostlinných buněk tím, že obsahují alespoň jednu molekulu nukleové kyseliny podle vynálezu, která se přirozeně v těchto buňkách nevyskytuje nebo tím, že molekula je integrována v určitém místě buněčného genomu, ve kterém se přirozeně nevyskytuje, tj. je v jiném genomovém prostředí.

Metodami, které jsou odborníkovi známé, mohou být z transgenní rostlinné buňky regenerovány celé rostliny. Tedy rostliny získané regenerací transgenních rostlinných buněk podle vynálezu jsou také předmětem předkládaného vynálezu. Dalším předmětem vynálezu jsou rostliny, které obsahují výše uvedené transgenní rostlinné buňky. Transgenní rostliny mohou být v principu rostliny jakéhokoliv požadovaného druhu, tj. jak

jednoděložné tak i dvouděložné. Výhodně jsou to užitkové rostliny, zvláště rostliny syntetizující škrob nebo rostliny ukládající škrob jako jsou např. obiloviny (žito, ječmen, oves, pšenice atd.), rýže, kukuřice, hrách, maniok (kasava) a brambory.

Tím, že jsou k dispozici molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu, a sice prostřednictvím technik rekombinantní DNA, je nyní možné specificky ovlivňovat metabolismus škrobu v rostlinách takovým způsobem, který doposud metodami klasického šlechtění nebyl možný. Takže metabolismus škrobu může být změněn takovým způsobem, že je syntetizován modifikovaný škrob, tj. škrob, který je změněn ve srovnání se škrobem syntetizovaným v rostlinách divokého typu co se týče jeho fyzikálně-chemických vlastností, zejména poměru amylozy k amylopektinu, stupně větvení, průměrné délky řetězce, obsahu fosfátu, chování při vytváření škrobového mazu (pastifikace), velikosti a/nebo tvaru škrobových zrn. Existuje tak možnost zvýšit výnos geneticky modifikovaných rostlin zvýšením aktivity proteinů popsanych ve vynálezu, a to např. nadměrnou expresí („overexpression“) příslušných molekul nukleové kyseliny nebo vytvářením mutantů, které již nejsou, co se týče jejich aktivity, nadále pod vlivem buněčně specifického regulačního schématu a/nebo mají odlišnou teplotní závislost. Ekonomický význam možnosti zasáhnout do syntézy škrobu u pšenice je zřejmý, neboť tato rostlina vytváří významné množství škrobu.

Je možné exprimovat molekuly nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu v rostlinné buňce s cílem zvýšit aktivitu příslušných syntáz škrobu nebo je možné vložit je do buněk, které obvykle neexprimují tento enzym. Dále molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být modifikovány metodami odborníkovi známými, aby vznikly syntázy škrobu podle vy-

nálezu, které již nadále nepodléhají buněčně specifickým regulačním mechanismům nebo mají modifikovanou teplotní závislost nebo substrátovou, popřípadě produktovou specificitu. Syntetizovaný protein vznikající expresí molekul nukleové kyseliny podle vynálezu může v principu být lokalizován v libovolném kompartmentu rostlinné buňky. Pro lokalizaci do specifického kompartmentu musí být deletována (odstraněna) sekvence pro lokalizaci do plastidu a zbývající kódující sekvence se případně spojí se sekvencí zajišťující lokalizaci v požadovaném kompartmentu. Takové sekvence jsou známy (viz např. Braun et al., EMBO J. 11, 1992, 3219-3227, Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, 846-850, Sonnewald et al., Plant J. 1, 1991, 95-106).

Vynález se také týká množitelského materiálu z rostlin podle vynálezu, např. plodů, semen, hlíz, podnoží, semenáčků, řízků, kalusů, buněčných kultur a pod.

Škrob získaný z transgenních rostlinných buněk nebo rostlin, a také z množitelského materiálu podle vynálezu, je také předmětem předkládaného vynálezu.

Díky expresi, případně dodatečné expresi, alespoň jedné molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu, transgenní rostlinné buňky nebo rostliny popsané ve vynálezu syntetizují škrob, který je ve srovnání se škrobem syntetizovaným rostlinami divokého typu modifikován např. ve fyzikálně-chemických vlastnostech, zvláště pokud jde o poměr amyloza/amylopektin, stupeň větvení, průměrnou délku řetězce, obsah fosfátů, vytváření škrobového mazu (pastifikace), velikost a/nebo tvar škrobových zrn, případně je tento škrob modifikován zvláště vzhledem k viskozitě a/nebo vlastnostem při vytváření gelu v lepidlech z tohoto škrobu.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu jsou transgenní rostlinné buňky, ve kterých je aktivita alespoň jednoho proteinu podle vynálezu snížena ve srovnání s netransformovanými rostlinami.

Pomocí molekul nukleové kyseliny podle vynálezu je možné připravit rostlinné buňky a rostliny, ve kterých je aktivita alespoň jednoho proteinu podle vynálezu snížena. To také vede k syntéze škrobu s modifikovanými chemickými a/nebo fyzikálními vlastnostmi ve srovnání se škrobem z netransformovaných buněk rostlin divokého typu.

Rostlinné buňky se sníženou aktivitou alespoň jednoho proteinu podle vynálezu je možné vytvořit např. tak, že se pomocí molekul nukleové kyseliny podle vynálezu exprimuje alespoň jedna odpovídající „anti-sense“ RNA (tj. RNA s orientací proti smyslu transkripce normální mRNA), nebo alespoň jedna „sense“ RNA (RNA s normální orientací) k dosažení kosupresního efektu, nebo se exprimuje alespoň jeden odpovídajícím způsobem konstruovaný ribozym, který specifickým způsobem štěpí transkripty (tj. molekuly RNA) kódující některý z proteinů podle vynálezu.

Pro expresi anti-sense RNA je možné použít molekuly DNA, které obsahují úplnou sekvenci kódující protein podle vynálezu, včetně případných sousedních sekvencí, stejně jako molekuly DNA obsahující pouze část kódující sekvence, přičemž tyto části musí být dostatečně dlouhé k tomu, aby bylo dosaženo anti-sense efektu v buňce. V podstatě se mohou použít sekvence s délkou 15 bp, výhodně s délkou 100 až 500 bp, pro účinnou anti-sense inhibici se však výhodně použijí sekvence s délkou větší než 500 bp. Obecně se užívají molekuly DNA kratší než 5000 bp, výhodně sekvence kratší než 2500 bp.

Mohou se také využít sekvence, které jsou vysoce homologní a přitom ne zcela identické se sekvencemi DNA molekul podle

vynálezu. Minimální homologie by měla být vyšší než 65 %. Výhodně se použijí sekvence s homologií mezi 95 a 100 %. Způsob snížení aktivity enzymů podle vynálezu v rostlinných buňkách pomocí efektu kosuprese je odborníkovi znám a jeho popis publikovali např. Jorgensen (Trends Biotechnol. 8, 1990, 340-344), Niebel et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197, 1995, 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197, 1995, 43-46), Palaqui a Vaucheret (Plant Mol. Biol. 29, 1995, 149-159), Vaucheret et al. (Mol. Gen. Genet. 248, 1995, 311-317), deBorne et al. (Mol. Gen. Genet. 243, 1994, 613-621) a další.

Expresi odpovídajících ribozymů s cílem snížit aktivitu určitých enzymů v buňce je také metoda odborníkovi známá a byla popsána např. v patentové přihlášce EP B1 0 321 201. Expresi ribozymů v rostlinných buňkách publikoval např. Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250, 1996, 329-338).

Předmětem předkládaného vynálezu jsou také rostliny obsahující výše popsané transgenní rostlinné buňky podle vynálezu. Tyto rostliny se mohou vytvořit regenerací rostlinných buněk v celé rostliny způsoby odborníkovi známými. Tyto rostliny jsou výhodně ty, které již byly uvedeny, zvláště užitkové rostliny, zejména rostliny syntetizující škrob nebo rostliny ukládající škrob. Zvláště výhodná rostlina je pšenice.

Vynález se také týká množitelského materiálu z rostlin podle vynálezu, zvláště plodů, semen, hlíz, podnoží, semenáčků, řízků, kalusů, buněčných kultur a pod.

Také škrob získaný z výše uvedených transgenních rostlinných buněk, rostlin nebo množitelského materiálu, je předmětem předkládaného vynálezu.

Díky snížení aktivity alespoň jednoho proteinu podle vynálezu transgenní rostlinné buňky nebo rostliny podle vynálezu syntetizují škrob, který je ve srovnání se škrobem syntetizovaným rostlinami divokého typu modifikován např. ve fyzikálně-chemických vlastnostech, zvláště pokud jde o poměr amyulóza/amylopektin, stupeň větvení, průměrnou délku řetězce, obsah fosfátů, vytváření škrobového mazu (pastifikace), velikost a/nebo tvar škrobových zrn. Tento škrob je případně modifikován např. vzhledem k viskozitě a/nebo vlastnostem při vytváření gelu v lepidlech z tohoto škrobu ve srovnání se škrobem získaným z rostlin divokého typu.

Škroby podle vynálezu mohou být modifikovány způsoby odborníci známými, pro potravinářství i v jiných oborech jsou vhodné jak v modifikované podobě, tak i nemodifikované.

Obecně se možnosti využití škrobu mohou rozdělit do dvou hlavních oblastí. Jedna oblast obsahuje hydrolyzované produkty škrobu, v podstatě glukózové a glukukanové složky získané enzymatickými nebo chemickými procesy. Tyto složky se mohou využít jako výchozí materiál pro další chemické modifikace a procesy, jako je např. fermentace. V této souvislosti může být důležité, že proces hydrolýzy se dá provést jednoduše a s nízkými náklady. V současné době se provádí v podstatě enzymaticky užitím amyloglukosidázy. Lze uvažovat o tom, že náklady by mohly být sníženy tím, že by se užívalo menší množství enzymu pro hydrolýzu vzhledem ke změně struktury škrobu, např. zvětšenému povrchu zrn, zlepšené štěpitelnosti díky slabšímu větvení nebo sterické struktury, která omezuje přístup použitého enzymu.

Druhá oblast, kde se škrob užívá pro svou polymerní strukturu je tzv. nativní škrob, a to ve dvou dalších oblastech:

1. Použití v potravinářství

Škrob je klasické aditivum pro různé potravinové výrobky, kde v podstatě slouží k tomu, že váže vodná aditiva a/nebo zvyšuje viskozitu nebo zvyšuje vytváření gelu. Důležitými vlastnostmi jsou chování při tečení a sorpci, teplota bobtnání a pastifikace, viskozita a zahušťovací schopnost, rozpustnost škrobu, transparence a struktura mazu, odolnost k teplu, smyku a kyselinám, tendence k retrogradaci, schopnost vytváření filmu, odolnost k mrznutí/tání, stravitelnost a také schopnost vytvářet komplexy např. s anorganickými nebo organickými ionty.

Výhodnou oblastí použití nativního škrobu je výroba pečiva a těstovin.

2. Použití v jiných oblastech než potravinářství

Druhou hlavní oblastí použití škrobu je užití škrobu jako adjuvans v různých výrobních procesech nebo jako aditiva v technických výrobcích. Hlavní oblastí použití škrobu jako adjuvans je papírenství a výroba lepenky. V tomto oboru se škrob využívá pro retenci (k zadržení pevných částic), pro klížení malých částic a klížení vnitřních vrstev lepenky, jako ztužovací látka a pro rehydrataci. Kromě toho se využívají výhodné vlastnosti škrobu s ohledem na tuhost, tvrdost, lesk, hladkost, odstín, pohmat, pevnost v dotržení a povrchové úpravy.

2.1. Výroba papíru a lepenky (kartónu)

V procesu výroby papíru lze odlišit čtyři oblasti použití, vytváření papírové plochy, povlékání, postřikování a vlastní celulózová hmota.

Požadavky na škrob z hlediska vytváření papírové plochy jsou nezbytně bělost, odpovídající viskozita, vysoká stabilita

viskozity, dobré vytváření tenké vrstvy (filmu) a také nízká tvorba prachu. Pro použití k povlákání hraje důležitou roli obsah pevných látek, viskozita, vysoká vazebná schopnost a vysoká afinita k pigmentu. Pro aditiva do celulózové hmoty jsou důležité vlastnosti rychlá, uniformní a bezeztrátová disperze, vysoká mechanická stabilita a úplná retence v celulózové hmotě (papírovině). Použije-li se škrob pro postřikování, je důležitý obsah pevných látek, viskozita a vysoká vazebná kapacita.

2.2. Výroba lepidel

Hlavní oblastí použití je výroba lepidel, kde lze použití rozdělit do čtyřech oblastí: použití čistého škrobového lepidla, použití ve škrobových lepidlech připravených se speciálními chemickými látkami, použití škrobu jako aditiva k syntetickým pryskyřicím a disperzím polymerů a použití škrobů jako nastavovacího plnidla pro syntetická lepidla. 90 % všech lepidel se škrobovým základem se užívá pro výrobu vlnité lepenky, papírových sáčků a pytlů, kompozitních materiálů z papíru a hliníku, krabic a také speciálních zvlhčovací lepidel na obálky, známky a pod.

2.3. Textilní průmysl

Další možností využití škrobu jako adjuvans a aditiva je při výrobě textilu a při výrobě přípravků pro ošetřování textilu. V textilním průmyslu lze použití rozdělit do čtyřech oblastí: použití škrobu jako klíždla, tj. jako adjuvans pro hlazení a odřepíkování a jako ochrana proti tažným silám při spřádání a také pro zvýšení odolnosti k oděru při spřádání, jako činidlo pro zlepšení kvality vláken zejména po kvalitě poškozujícím ošetření, jako je např. bělení nebo barvení, jako zahušťovadla při přípravě barevných past k zabránění

difúze barviva a jako aditiva k snovacímu činidlu pro šicí nitě.

2.4. Stavebnictví

Čtvrtou oblastí využití škrobu je jeho použití jako aditiva ve stavebních materiálech. Jedním příkladem je výroba sádko-kartonových desek, kde škrob přimíchný do řídké sádky vytváří s vodou maz, difunduje na povrch sádkové desky a tím váže karton k desce. Dalším způsobem využití je smíchání se sádkou nebo minerálními vlákny. V suché betonové směsi se může škrob použít pro zpomalení klíživého procesu.

2.5. Stabilizace zeminy

Dále je škrob výhodný pro výrobu prostředků pro stabilizaci zeminy pro dočasnou ochranu zemních částic proti vodě při umělých přesunech půdy. Podle současného stavu techniky v oboru se má zato, že kombinace produktů obsahujících škrob a polymerové emulze má stejný vliv na redukci eroze a inkrustace jako dosud užívané materiály, avšak je podstatně levnější.

2.6. Použití škrobu v ochraně a ve výživě rostlin

Další oblastí využití je použití škrobu v prostředcích ochrany rostlin pro modifikaci specifických vlastností těchto prostředků. Např. škroby se užívají pro zlepšení smáčivosti prostředků ochrany rostlin nebo hnojiv, pro dávkované uvolňování aktivní látky, pro konverzi kapalných, těkavých a/nebo zapáchajících aktivních látek do mikrokystalické, stabilní, deformovatelné látky, pro míchání nekompatibilních sloučenin a pro prodloužení trvání účinku v důsledku snížení rozpadu.

2.7. Farmaceutický a kosmetický průmysl

Škrob se může použít také ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Ve farmaceutickém průmyslu se může použít jako pojivo pro tablety nebo pro ředění pojiva v kapslích. Dále je škrob vhodný jako dezintegrant pro tablety, neboť po spolknutí absorbuje tekutinu a po krátké době nabobtná tolik, že se uvolní aktivní látka. Z kvalitativních důvodů jsou medicínální masti a pudry další oblastí použití. V oblasti kosmetiky se může škrob použít jako nosič aditiv k pudru, jako jsou např. vonné látky nebo kyseliny salicylová. Oblastí extenzivního využití škrobu jsou zubní pasty.

2.8. Škrob jako aditivum do uhlí a briket

Lze také uvažovat o využití škrobu jako aditiva do uhlí a briket. Přídavkem škrobu se může uhlí kvantitativně aglomerovat a/nebo vytvářet vysoce kvalitní brikety, přičemž se zabrání předčasnému rozpadu briket. Obsahuje-li uhlí na grilování přídavek škrobu v rozmezí 4 až 6%, zvýší se kalorická výhřevnost o 0,1 až 0,5 %. Kromě toho je škrob vhodný jako vazebné činidlo, neboť přídavek škrobu do uhlí a briket může významně redukovat emise toxických látek.

2.9. Zpracování rudných a uhelných kalů

Dále se škrob dá použít jako flokulační činidlo při zpracovávání rudných a uhelných kalů.

2.10. Škrob jako aditivum při odlévání

Další oblastí využití škrobu je použití jako aditiva k materiálům potřebným při odlévání. Pro různé způsoby odlévání se vytvářejí formy z písků smíchaných se spojovacím agens. V současnosti je nejběžnějším spojovacím agens bentonit smíchaný s modifikovanými škroby, většinou bobtnavými škroby.

Důvodem pro přidávání škrobu je zvýšení odporu proti proudění současně se zlepšením spojovací síly. Avšak bobtnavé škroby by splnily lépe požadavky výrobního procesu, např. pro svou rozpustnost ve studené vodě, schopnost rehydratace, dobrou mísitelnost s pískem a vysokou schopnost vázat vodu.

2.11. Použití škrobu v gumárenském průmyslu

V gumárenském průmyslu se škrob může použít pro zlepšení technické a optické kvality. Důvody jsou zlepšení povrchového lesku, pohmatu a vzhledu. Pro tento účel je škrob dispergován na lepkavém zgumovatěném povrchu gumových látek před vulkanizací za studena. Škrob se může také použít pro zlepšení potiskovatelnosti gummy.

2.12. Výroba náhražek kůže

Další oblastí využití modifikovaného škrobu je výroba náhražek kůže.

2.13. Škrob v syntetických polymerech

V oblasti plastů se objevují následující možnosti aplikace: použití produktů ze škrobu ve výrobním procesu (škrob je jako plnidlo, není zde přímá vazba mezi syntetickým polymerem a škrobem), nebo integrace produktů pocházejících ze škrobu přímo do výroby polymeru (škrob a polymer vytvářejí stálou vazbou).

Použití škrobu jako pouhého plnidla nemůže soutěžit s jinými látkami jako např. talkem. Situace je zcela odlišná, pokud začnou působit specifické vlastnosti škrobu a profil vlastností výsledného produktu se jasně změní. Příkladem je použití škrobových produktů ve zpracování termoplastických materiálů, jako je např. polyetylén. Škrob a syntetický polymer se smíchají v poměru 1:1 prostřednictvím koexprese, čímž

se vytváří tzv. hlavní várka (master batch), ze které se pak vytvářejí různé produkty známými způsoby pomocí granulovaného polyetylénu. Integrace škrobu do polyetylenových filmů může způsobit zvýšenou propustnost pro látky v dutinách, zlepšenou propustnost pro vodní páru, zlepšené antistatické a protiblokovací vlastnosti, a také zlepšenou potiskovatelnost vodou ředitelnými barvami.

Další možností je použití škrobu v polyuretanových filmech. Díky adaptaci derivátů škrobu a díky optimalizaci způsobu zpracování, je možné specificky řídit reakci mezi syntetickými polymery a hydroxylovými skupinami škrobu. Výsledkem jsou polyuretanové filmy, které díky škrobu mají následující vlastnosti: snížený koeficient teplotní rozpínavosti, snížené smršťování, zlepšené tlakové/tenzní vlastnosti, zvýšenou propustnost pro vodní páru bez ovlivnění jímavosti vody, sníženou hořlavost a hustota trhlin, žádný odpad hořlavých částic, žádné halogenidy a redukované stárnutí. Přetrvávajícími nedostatky jsou snížená tlaková a rázová pevnost.

Ale vývoj výroba filmů není jediná možnost. Také pevné plastové výrobky, jako nádoby, talíře a kelímky se mohou vyrábět s obsahem škrobu vyšším než 50 %. Směsi škrob/polymer nabízejí navíc tu výhodu, že jsou snadněji biodegradovatelné.

Kromě toho pro svou extrémní schopnost vázat vodu škrobové „roubované“ polymery jsou velmi významné. To jsou takové produkty, které mají páteř ze škrobu a postraní mřížku syntetického monomeru naroubovaného podle principu radikálového řetězového mechanismu. Škrobové roubované polymery nyní dostupné mají zlepšenou schopnost vázat a udržet vodu, a to až 1000 g vody na 1 g škrobu při vysoké viskozitě. Tyto superabsorbující látky se užívají hlavně v oblasti hygieny v takových výrobcích jako jsou např. pleny a povlečení, a také v zemědělství, např. pro peletizaci semen.

Pro použití nového škrobu modifikovaného technikami rekombinantní DNA jsou rozhodující na jedné straně struktura, obsah vody, obsah proteinu, obsah lipidů, obsah vlákniny, obsah popelovin, obsah fosfátu, poměr amyulóza/amylopektin, distribuce relativní molekulové hmotnosti, stupeň větvení, velikost a tvar zrna a krystalizace, a na druhé straně vlastnosti ovlivňující následující charakteristiky: tekutost a sorpční vlastnosti, teplota pastifikace, viskozita a zahušťovací schopnost, rozpustnost škrobu, transparence a struktura mazu, odolnost k teplu, smyku a kyselinám, tendence k retrogradaci, schopnost vytváření gelu, odolnost k mrznutí/tání, schopnost vytvářet komplexy, vazba jodu, filmotvornost, lepihost, enzymová stabilita, stravitelnost a reaktivita.

Příprava modifikovaného škrobu prostřednictvím genetických manipulací s transgenní rostlinou může modifikovat vlastnosti škrobu takto získaného z rostlin takovým způsobem, že nevyžaduje další modifikace chemickými nebo fyzikálními metodami. Na druhé straně škroby modifikované technikami rekombinantní DNA mohou být ještě dále modifikovány chemicky, což povede k dalšímu zlepšení kvality pro určité výše popsané oblasti využití. Takové chemické modifikace jsou v podstatě odborníkovi známé. Jsou to zejména modifikace získané:

-působením tepla

-působením kyseliny

-oxidací

-esterifikací,

příčemž tyto modifikace vedou k vytváření fosfátu, nitrátu, sulfátu, xanthátu, acetátu a citrátu škrobu. Pro esterifikaci se mohou užít další organické kyseliny.

-vytvářením éterů škrobu

jako je např. alkyléter škrobu, O-allyléter škrobu, hydroxy-alkyléter a O-karboxymetyléter škrobu, étery škrobu obsahující dusík, fosfor anebo síru,
-vytvářením rozvětvených škrobů
-vytvářením škrobových roubovaných polymerů (viz výše).

Škroby podle předkládaného vynálezu se výhodně používají pro výrobu balicích materiálů a materiálů pro jednorázové použití.

Pro expresi molekul nukleové kyseliny podle vynálezu, buďto v sense nebo anti-sense orientaci, se tyto molekuly spojí s regulačními prvky DNA, které zajistí transkripci v rostlinné buňce. Takové regulační prvky jsou zejména promotory. Pro expresi se v podstatě může použít jakýkoliv promotor aktivní v rostlinné buňce.

Promotor se vybere tak, že exprese probíhá konstitutivně nebo jen v určitém pletivu nebo jen v určitém okamžiku vývoje rostliny a nebo v okamžiku určeném vnějšími okolnostmi. Vzhledem k rostlině může být promotor homologní nebo heterologní. Vhodné promotory pro konstitutivní expresi jsou např. promotor 35S RNA z viru mozaiky tabáku (CMV) a ubichitinový promotor z kukuřice. Pro expresi specifickou pro hlízy brambor se může použít promotor B33 patatinového genu (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, 1989, 23-29). Příkladem promotoru, který zajišťuje expresi pouze ve fotosynteticky aktivním pletivu je promotor ST-LS1 (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1987, 7943-7947, Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445-2451. Pro expresi specifickou pro endosperm je vhodným promotorem promotor HMG z pšenice, promotor USP, promotor fazeolinu nebo jsou vhodné promotory zeinových genů z kukuřice. Dále existují terminační sekven-

ce, které slouží ke správnému ukončení transkripce a k tomu, aby byla přidána poly-A sekvence k transkriptu, která ho stabilizuje. Takové prvky jsou popsány v literatuře (viz např. Gielen et al., EMBO J. 8, 1989, 23-29) a mohou být na přání vyměněny.

Předkládaný vynález poskytuje molekuly nukleové kyseliny kódující významné typy syntáz škrobu z pšenice. To umožňuje identifikovat funkci těchto izotypů v biosyntéze škrobu a také vytvářet geneticky modifikované rostliny, ve kterých je aktivita alespoň jednoho z těchto enzymů modifikována. To vede k tomu, že takto modifikované rostliny syntetizují škrob s modifikovanou strukturou a tudíž i s modifikovanými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

Molekuly nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu se mohou použít také k vytvoření rostlin, ve kterých je aktivita alespoň jednoho enzymu podle vynálezu buďto snížena nebo zvýšena a současně aktivity dalších enzymů účastnících se biosyntézy škrobu jsou modifikovány. Tudíž lze uvažovat o všech možných kombinacích a permutacích. Modifikací aktivity jednoho nebo více izotypů syntázy škrobu v rostlinách lze dosáhnout syntézy škrobu s modifikovanou strukturou. Zvýšením aktivity jednoho nebo více izotypů syntázy škrobu v buňkách pletiva ukládajícího škrob v transformovaných rostlinách, jako je např. endosperm pšenice nebo kukuřice nebo v hlízách brambor, lze dosáhnout zvýšení výnosů. Tak např. molekuly nukleové kyseliny kódující protein podle vynálezu, nebo odpovídající anti-sense konstrukty, mohou být integrovány do rostlinných buněk, ve kterých je syntéza endogenních proteinů GBSSI, SSS nebo GBSSII již inhibována prostřednictvím anti-sense efektu nebo mutací, nebo ve kterých je syntéza větvicího enzymu inhibována (viz např. Nakamura et al., loc. cit.)

Má-li být dosaženo inhibice syntézy několika syntáz škrobu v transformovaných rostlinách, mohou být pro transformaci použity molekuly DNA, které současně obsahují několik oblastí v anti-sense orientaci řízených vhodným promotorem a kódujících odpovídající syntázy škrobu. Takto může být každá sekvence řízena svým vlastním promotorem anebo mohou být sekvence transkribovány jako fúze ze společného promotoru. Poslední alternativa bude obecně výhodná, neboť v tomto případě by syntéza příslušných proteinů měla být inhibována do přibližně stejné míry.

Kromě toho je možné konstruovat molekuly DNA, které, nehledě na sekvence DNA kódující syntázy škrobu, obsahují další sekvence DNA kódující další proteiny zapojené do syntézy škrobu nebo jeho modifikace. Takto mohou být sekvence opět spojeny do sérií a být přepisovány ze společného promotoru. Pro jednotlivé kódující oblasti používané v takovém konstruktu jsou výše uvedená fakta týkající se tvorby anti-sense konstruktů také platná. Není žádný horní limit pro počet anti-sense fragmentů přepisovaných z promotoru v takové molekule DNA. Avšak výsledný transkript by neměl být delší než 10 kb, výhodně 5 kb.

Kódující oblasti, které jsou lokalizované v anti-sense orientaci za vhodným promotorem v takových molekulách DNA v kombinaci s dalšími kódujícími oblastmi, mohou pocházet ze sekvencí DNA kódujícími následující proteiny: syntázy škrobu vázané na zrna (GBSS I a II), další rozpustné škrobové syntázy, větvicí enzymy, a štěpicí „debranching“ enzymy a „disproportionizing“ enzymy a také fosforylázy škrobu. Tento výčet slouží pouze jako příklad. Použití dalších sekvencí DNA v rámci takové kombinace také připadá v úvahu.

Pomocí takových konstruktů je možné inhibovat v rostlinných buňkách transformovaných těmito molekulami syntézu několika enzymů současně.

Kromě toho konstrukty mohou být integrovány do klasických mutantů, které jsou defektní v jednom nebo více genech biosyntézy škrobu. Tyto defekty se mohou týkat následujících proteinů: syntázy škrobu vázané na zrna (GBSS I a II) a rozpustné syntázy škrobu (SSS I a II), větvicí enzymy (BE I a II), „debranching“ enzymy (R-enzymy), „disproportionizing“ enzymy a fosforylázy škrobu. Tento výčet slouží pouze jako příklad.

Prostřednictvím této strategie je dále možné inhibovat v rostlinných buňkách transformovaných těmito molekulami nukleové kyseliny syntézu několika enzymů současně.

Pro integraci cizorodých genů do vyšších rostlin je k dispozici velký počet klonovacích vektorů, které obsahují replikační signál pro *E. coli* a genový marker pro selekci transformovaných bakteriálních buněk. Příklady takových vektorů jsou pBR322, vektory série pUC a série M13mp, pACYC184 atd. Požadovaná sekvence může být vložena do vektoru ve vhodném restriční místě. Získaný plazmid se použije pro transformaci buněk *E. coli*. Transformované buňky *E. coli* jsou pěstovány ve vhodném živném médiu a následně sklizeny a lyzovány a z nich je získán plazmid. Jako analytické metody pro charakterizaci získané plazmidové DNA se obecně používají restriční analýza, elektroforéza v gelu a další biochemické metody a metody molekulární biologie. Po každé manipulaci může být plazmidová DNA naštěpena a získané fragmenty DNA mohou být spojeny s dalšími sekvencemi DNA. Každá plazmidová DNA může být klonována do stejných nebo jiných plazmidů. Pro integraci DNA do rostlinných hostitelských buněk je k dispo-

zici celá řada technik. Tyto techniky zahrnují transformaci rostlinných buněk T-DNA za použití *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Agrobacterium rhizogenes* jako prostředníka transformace, fúzi protoplastů, injekci a elektroporaci DNA, integraci DNA biolistickou metodou (bombardování mikročásticemi), jakož i další možnosti.

V případě injekce, biolistické metody a elektroporace DNA do rostlinných buněk nejsou na použité plazmidy žádné speciální požadavky. Mohou být použity jednoduché plazmidy, jako deriváty pUC. Ale v případě, že mají být regenerovány z buněk transformovaných takovým způsobem celé rostliny, měl by být přítomen selektivní genový marker.

V závislosti na metodě integrace požadovaných genů do rostlinné buňky mohou být nutné další sekvence DNA. Je-li použit Ti-plazmid nebo Ri-plazmid, např. pro transformaci rostlinné buňky, měla by být obvykle alespoň pravá hranice, ale častěji pravá i levá hranice Ti- a Ri-plazmidové T-DNA spojena s cizorodým genem, který má být integrován jako sousední oblast.

Použije-li se pro transformaci *Agrobacterium*, měla by být DNA, která má být integrována, klonována do speciálních plazmidů, jmenovitě buď do intermediárního vektoru nebo do binárního vektoru. Kvůli sekvenčním homologiím k sekvencím v T-DNA, mohou být intermediární vektory integrovány do Ti- nebo Ri-plazmidu *Agrobacterium* díky homologní rekombinaci. To také obsahuje oblast „vir“ nutnou pro přenos T-DNA. Intermediární vektory se nemohou replikovat v *Agrobacterium*. Prostřednictvím pomocného plazmidu může být intermediární vektor přenesen do *Agrobacterium tumefaciens* (konjugace). Binární vektory se mohou replikovat jak v *E. coli*, tak i v *Agrobacterium*. Obsahují selektivní genový marker, jakož i linker nebo polylinker, který je ohraničen pravou a levou

T-DNA hraniční oblastí. Mohou být transformovány přímo do *Agrobacterium* (Holsters et al., Mol. Gen. Genet., 163, 181-187, 1978). *Agrobacterium* působící jako hostitelská buňka by mělo obsahovat plazmid nesoucí úsek „vir“. Tento úsek „vir“ je obvykle nezbytný pro přenos T-DNA do rostlinné buňky. Může být přítomna další T-DNA. *Agrobacterium* transformované takovým způsobem se používá pro transformaci rostlinných buněk.

Použití T-DNA pro transformaci rostlinných buněk bylo intenzivně zkoumáno a dostatečně popsáno v EP 120 516 a dále je popsali Hoekema: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukerij Kanters B.V., Alblasserdam, 1985, kapitola V, Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 a An et al., EMBO J., 4, 277-287, 1985.

Pro přenášení DNA do rostlinných buněk mohou být rostlinné explantáty vhodně kultivovány společně s *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Agrobacterium rhizogenes*. Z infikovaného rostlinného materiálu (např. kousky listů, segmenty stonku, kořeny, ale také protoplasty nebo rostlinné buňky pěstované v suspenzi) mohou být poté regenerovány celé rostliny ve vhodném živném médiu, které může obsahovat antibiotika nebo biocidní látky pro selekci transformovaných buněk. Rostliny získané tímto způsobem mohou být poté vyšetřovány na to, zda je integrovaná DNA přítomna nebo ne. Další možnosti, jak integrovat cizorodou DNA využitím biolistické metody nebo transformací protoplastů jsou odborníkovi známy (viz např. Willmitzer, L., 1993, Transgenic Plants. V: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, editoři), díl, 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Alternativní systémy pro transformaci jednoděložných rostlin jsou transformace biolistickou metodou, elektricky nebo chemicky vyvolaná integrace DNA do protoplastů, elektroporace částečně permeabilizovaných buněk, makroinjekce DNA do květu, mikroinjekce DNA do mikrospór a pro-embryí, integrace DNA klíčícím pylem a integrace DNA bobtnáním embryí (viz přehled Potrykus, *Physiol. Plant*, 269-273, 1990).

Zatímco transformace dvouděložných rostlin vektorovými systémy založenými na Ti-plazmidu pomocí *Agrobacterium tumefaciens* je dobře zavedená metoda, novější studie naznačují, že transformace vektory založenými na *Agrobacterium* může být také použita v případě jednoděložných rostlin (Chan et al., *Plant Mol. Biol.*, 22, 491-506, 1993, Hiei et al., *Plant J.*, 6, 271-282, 1994, Bytebier et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5345-5349, 1987, Raineri et al., *Bio/Technology*, 8, 33-38, 1990, Gould et al., *Plant Physiol.*, 95, 426-434, 1991, Mooney et al., *Plant, Cell Tiss. & Org. Cult.*, 25, 209-218, 1991, Li et al., *Plant Mol. Biol.*, 20, 1037-1048, 1992).

Tři z výše uvedených transformačních systémů byly v minulosti zavedeny pro různé druhy obilovin: elektroporace rostlinné tkáně, transformace protoplastů a přenos DNA bombardováním mikročásticemi v regenerativní tkáni a buňkách (viz přehled Jähne et al., *Euphytica* 85, 35-44, 1995).

V odpovídající literatuře je popsáno několik způsobů transformace pšenice (přehled v Maheshwari et al., *Critical Reviews in Plant Science*, 14 (2), 149-178, 1995).

Hess et al. (*Plant Sci*, 72, 233, 1990) používali makroinjekci, aby dostali pyl a *Agrobacterium* blízko k sobě. Mobilizace plazmidu obsahujícího gen *nptII* jako selektivní marker byla prokázána pomocí analýzy Southernovým přenosem a testem NPTII. Transformanty utvořily normální fenotyp a byly fer-

tilní. Rezistence na kanamycin mohla být prokázána ve dvou po sobě jdoucích generacích.

První transgenní fertilní rostlina pšenice, která mohla být regenerována po bombardování mikroprojektily s navázanou DNA, byla popsána Vasilem et al. (Bio/Technology, 10, 667-674, 1992). Cílovou tkání pro bombardování byla tkáňová kultura embryogenního kalusu (kalus typu C). Jako selektivní genový marker byl použit gen *bar*, kódující fosfinotricinfosfotransferázu, a tudíž poskytující rezistenci k herbicidu fosfinotricinu.

Další systém byl popsán Weeksem et al. (Plant Physiol., 102, 1077-1084, 1993), a také Beckerem et al. (Plant J., 5(2), 299-307, 1994). Jako cílová tkáň pro transformaci DNA bylo zde použito scutellum (pletivo štítku) nezralých embryí. V úvodu *in vitro* fáze scutellum indukovalo somatická embrya. Účinnost transformace je podstatně vyšší v systému vyvinutém Beckerem et al. (loc. cit.), s 1 transgenní rostlinou na 83 embryí druhu „Florida“, než v systému zavedeném Weeksem et al., s 1 až 2 transgenními rostlinami na 1000 embryí druhu „Bobwhite“.

Systém vyvinutý Beckerem et al. (loc. cit.) tvoří základ pro transformační experimenty popsané v příkladech.

Jakmile je jednou zavedená DNA integrována v genomu rostlinné buňky, je zde obvykle nadále stabilní, a také zůstává u potomků původně transformované buňky. Obvykle obsahuje selektivní marker, který transformovaným rostlinným buňkám propůjčuje rezistenci proti biocidní látce, jako je fosfinotricin, nebo proti antibiotiku, jako je kanamycin, G 418, bleomycin nebo hygromycin atd. Individuálně vybraný marker by měl proto umožnit selekci transformovaných buněk proti buňkám postrádajícím integrovanou DNA.

Transformované buňky rostou obvyklým způsobem v rostlinách (viz také McCormick et al., Plant Cell Reports, 5, 81-84, 1986). Výsledné rostliny mohou být pěstovány obvyklým způsobem a kříženy s rostlinami majícími stejný transformovaný genetický základ nebo odlišný genetický základ. Výslední hybridní jedinci mají odpovídající fenotypové vlastnosti. Rostliny pak tvoří semena.

Měly by se pěstovat dvě nebo více generací, aby bylo jisté, zda se fenotypové vlastnosti stabilně udržují a zda jsou přenášeny. Kromě toho by se semena měla sbírat, aby bylo jisté, že odpovídající fenotyp nebo další vlastnosti zůstanou.

Příklady provedení vynálezu

V příkladech se používají následující metody:

1. Klonování

Pro klonování v *E. coli* byl použit vektor pBluescript II SK (Stratagene).

2. Bakteriální kmeny

Pro vektor Bluescript a pro anti-sense konstrukty byl použit kmen *E. coli* DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA). Pro *in vivo* excisi byl použit kmen *E. coli* XL1-Blue.

3. Transformace nezralých embryí pšenice

Použitá kultivační média

médium MS: 100 ml/l makrosoli (směs makroelementů)
1 ml/l mikrosoli (směs mikroelementů)
2 ml/l Fe/NaEDTA
30 g/l sacharózy

(D. Becker a H. Lörz, Plant Tissue Culture Manual, 1996, B12: 1-20)

médium č. 30: MS + 2,4-D (2 mg/l)

médium č. 31: MS + 2,4-D (2 mg/l) + fosfinotricin (PPT,
aktivní složka herbicidu BASTA[®] (2mg/l))

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

médium č. 39: MS + 2,4-D (2 mg/l)
+ každý z 0,5 M manitol/sorbitol

Uvedená média byla upravena na hodnotu pH 5,6 pomocí KOH
a ztužena přídatkem 0,3 % Gelritu.

Způsob pro transformaci nezralých embryí z pšenice byl vyví-
nut a optimalizován Beckerem a Lörzem (D. Becker a H. Lörz,
Plant Tissue Culture Manual, 1996, B12: 1-20).

V pokusech popsaných dále byl sledován laboratorní protokol
stanovený Beckerem a Lörzem (*loc. cit.*).

Pro transformaci se odeberou klasy s obilkami ve vývojovém stadiu 12 až 14 dnů po anthesi a povrchově se sterilizují. Izolovaná scutella jsou vysazena na indukční médium č. 30 tak, že osa embrya leží čelně k médiu.

Po 2 až 4 dnech předběžné kultivace (26 °C, tma) jsou explantáty přeneseny na médium č. 39 pro osmotickou prekultivaci (2-4 h, 26 °C, tma).

Pro biolistickou transformaci se pro každý výstřel používá 29 µg částic zlata, na kterých precipitovalo 5 µg nebo 73 ng cílové DNA. Protože prováděné pokusy jsou kotransformace, cílová DNA skládající se z cílového genu a genu pro marker rezistence (gen *bar*), se do precipitační směsi dává v poměru 1:1.

4. Značení fragmentů DNA pomocí DIG

Značení fragmentů DNA, které se používaly jako sondy pro testování (screening), se dosahovalo specifickou PCR (polymerázovou řetězovou reakcí) prostřednictvím inkorporace dUTP značených DIG (digoxigeninem) (Boehringer Mannheim, Německo).

Příklad 1

Identifikace, izolace a charakterizace cDNA kódující rozpustnou syntázu škrobu z pšenice (*Triticum aestivum* L., cv. Florida)

Syntéza cDNA vycházela z poly(A)⁺RNA přibližně 21 dnů starých pšeničných obilek. Všechny pokusy dále zmiňované se prováděly podle laboratorního protokolu výrobce (ZAP-cDNA Synthesis Kit a ZAP-cDNA Gigapack II Gold Cloning Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg).

Po určení titru knihovny cDNA byl nalezen primární titr $1,25 \times 10^6$ pfu/ml. Testování se provádělo pomocí fragmentu DNA značeného DIG. Takto byl jako sonda použit fragment PCR značený DIG kódující část fragmentu rozpustné syntázy škrobu z rýže (Baba et al., *loc.cit.*). Oligonukleotidové primery používané pro PCR měly sekvence:

R₁: ACA GGA TCC TGT GCT ATG CGG CGT GTG AAG (i. č. 3)

R₂: TTG GGA TCC GCA ATG CCC ACA GCA TTT TTT TC (i. č. 4)

Pro testování bylo vyseto přibližně 5×10^4 pfu na misku (15 cm v průměru). Byly vybrány pozitivní klony. Pomocí excize *in vivo* byly získány vybrané klony jako pBluescript SK(-) fagemidy.

Po analýze klonů pomocí minipreparace a po restrikci plazmidové DNA byl dále zpracováván klon TaSSS.

Příklad 2

Sekvenční analýza inzertu cDNA z plazmidu pTaSSS

Izolovala se plazmidová DNA klonu TaSSS a sekvence inzertu cDNA se určovala pomocí dideoxynukleotidové metody (Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1977, 5463-5467).

Nejdříve se určila částečná sekvence obsahující nukleotidy 186 až 2239, jak uvedeno v sekvenci i. č. 1, která obsahovala přídatný zbytek G na svém 5'-konci. Inzert klonu TaSSS je dlouhý 2239 bp a tvoří téměř plnou délku cDNA. Nukleotidová sekvence je uvedena v sekvenci i. č. 1. Odpovídající aminokyselinová sekvence je uvedena jako sekvence i. č. 2. Předpokládané štěpné místo signálního peptidu je lokalizováno mezi aminokyselinovými zbytky 33 a 34, jak je vyznačeno v sekvenci i. č. 1.

Sekvenční analýza a srovnání s již publikovanými sekvencemi ukázaly, že sekvence uvedená jako sekvence i. č. 1 je nová a obsahuje téměř plnou délku kódující oblasti, která je homologní s rozpustnými syntázami škrobu z jiných organismů. Pomocí částečné sekvence cDNA z TaSSS je možné pro odborníka z oboru molekulární biologie izolovat chybějící oblast v 5'-oblasti a získat tak kompletní klon cDNA. Pro tento účel se 5'-oblast klonu TaSSS může použít jako sonda pro testování celé cDNA a kompletní klon může být izolován za použití standardních metod prostřednictvím hybridizace. Na druhé straně může být získán chybějící 5'-konec použitím metody „5'-Race“ (např. od Boehringer Mannheim nebo jiných výrobců).

Příklad 3

Produkce rostlinného transformačního vektoru pTaSSS-as

Aby se exprimovala antisense RNA k izolované cDNA ze pšenice, byl navržen rostlinný transformační vektor na bázi pUC19, jako základního plazmidu, ve kterém je inzert cDNA plazmidu pTaSSS spojen s fragmentem DNA v anti-sense orientaci, kde je exprese regulována ubichitinovým promotorem. Tento promotor se skládá z prvního netranslatovaného exonu a prvního intronu genu pro ubichitin 1 z kukuřice (Christensen, A.H. et al., *Plant Molecular Biology* 18, 1992, 675-689).

Části polylinkeru a NOS-terminátoru jsou získány z plazmidu pAct1.cas (CAMBIA, TG 0063, Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Austrálie). Vektorové konstrukty s tímto terminátorem a konstrukty založené na pAct1.cas jsou popsány v McElroy et al. (*Molecular Breeding* 1, 1995, 27-37). Pro transformaci pšenice byl použit pTaSSS, jak již bylo popsáno.

Příklad 4

Identifikace, izolace a charakterizace další cDNA kódující syntázu škrobu z pšenice (*Triticum aestivum* L., cv. Florida)

Při srovnání sekvencí doposud známých sekvencí kódujících rostlinné rozpustné syntázy a syntázy vázané na zrna bylo zjevné, že mezi různými proteiny existují tři silně konzervativní oblasti.

Aby se izolovaly rozpustné syntázy škrobu z pšenice, byly tyto tři oblasti vybrány pro přípravu polyklonálních peptidových protilátek. Byly tudíž vytvořeny tři syntetické polypeptidy s následujícími aminokyselinovými sekvencemi:

Peptid 1: NH₂-PWSKTGGLGDVC-COOH (sekvence i. č. 7)

Peptid 2: NH₂-PSRFEPCLNQLY-COOH (sekvence i. č. 8)

Peptid 3: NH₂-GTGGLRDTVENC-COOH (sekvence i. č. 9)

Tyto peptidy byly spojeny s nosičem KLH (homocyanin z přílipky) a pak použity pro tvorbu polyklonálních protilátek v králících (Eurogentec, Seraing, Belgie).

Následující protilátky byly navrženy, jak uvádí přehled:

anti-SS1 - polyklonální protilátka proti peptidu 1

anti-SS2 - polyklonální protilátka proti peptidu 2

anti-SS3 - polyklonální protilátka proti peptidu 3.

Protilátky byly následně použity pro testování knihovny cDNA z pšeničných obilek a vyhledávání sekvence kódující syntázy škrobu z pšenice. Pro tento účel byla použita expresní knihovna cDNA vytvořená jak bylo popsáno v příkladu 1. Aby se analyzovaly fágové plaky, byly plaky přeneseny na nitro-

celulózové filtry, které byly předem inkubovány v 10 mM roztoku IPTG po 30-60 minut a následně usušeny na papíru Whatman. Přenos trval 3 hodiny v 37 ° C. Poté se filtry inkubovaly v blokujícím roztoku 30 minut při teplotě místnosti a dvakrát se promyly v pufru TBST 5-10 minut. Filtry se třepaly s polyklonálními protilátkami ve vhodném ředění 1 hodinu při teplotě místnosti nebo 16 hodin při 4 ° C. Identifikace plaků exprimujících protein, které byly rozpoznány jednou z protilátek, se prováděla pomocí soupravy Immun-Blot Assay s kozím proti-králičím IgG (Biorad) podle doporučení výrobce.

Klony fága z knihovny cDNA exprimující protein, které byly rozpoznány jednou z protilátek, byly dále purifikovány standardními metodami. Prostřednictvím metody excise *in vivo* (Stratagene) se z pozitivních fágových klonů vytvořily klony *E. coli*, které obsahovaly dvojvláknový plazmid pBluescript II SK s odpovídajícím inzertem cDNA mezi místy polylinkeru EcoRI a XhoI. Po zkontrolování velikosti a restričního vzorce inzertu byl vhodný kmen, tj. TaSS1, podroben sekvenční analýze.

Příklad 5

Sekvenční analýza inzertů cDNA z plazmidu pTaSS1

~~Izolovala se plazmidová DNA z klonu pTaSS1 a sekvence inzertu cDNA se určovala pomocí standardních postupů použitím dideoxynukleotidové metody (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1977, 5463-5467).~~

Nejdříve byla určena částečná sekvence obsahující nukleotidy 1084 až 2825, jak je uvedeno v sekvenci i. č. 5. Inzert klonu pTaSS1 je dlouhý 2825 bp a tvoří kompletní cDNA. Nukleo-

tidová sekvence je uvedena v sekvenci i. č. 5. Odpovídající aminokyselinová sekvence je uvedena jako sekvence i. č. 6. Sekvenční analýza a srovnání s již publikovanými sekvencemi ukázaly, že sekvence zde uvedená jako sekvence i. č. 5 je nová a obsahuje kódující oblast projevující homologii se syntázami škrobu z jiných organismů. Předpokládá se, že tato cDNA kóduje protein, který má biologickou aktivitu syntázy škrobu vázané na zrna.

Kromě toho díky homologiím se známými obdobnými sekvencemi pro štěpná místa signálního peptidu bylo zjištěno, že předpokládaný signální tranzitní peptid je štěpen mezi pozicemi 57 a 58 nebo mezi pozicemi 60 a 61 v aminokyselinové sekvenci, jak je ukázáno v sekvenci i. č. 6.

Příklad 6

Příprava rostlinného transformačního vektoru pTaSS1-as

Aby se exprimovala částečná anti-sense RNA odpovídající izolované cDNA ze pšenice, byl vytvořen rostlinný transformační vektor na bázi plazmidu pUC19. Rostlinný transformační vektor částečně obsahuje inzert cDNA plazmidu pTaSS1 v anti-sense orientaci. Exprese je regulována ubichitinovým promotorem. Tento promotor se skládá z prvního netranslatovaného exonu a prvního intronu genu pro ubichitin 1 z kukuřice (Christensen, A.H. et al., *Plant Molecular Biology* 18, 1992, 675-689).

Části polylinkeru a NOS-terminátoru jsou získány z plazmidu pAct.cas (CAMBIA, TG 0063, Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Austrálie). Vektorové konstrukty s tímto terminátorem a konstrukty založené na pAct1.cas jsou popsány v McElroy et al. (*Molecular Breeding* 1, 1995, 27-37).

Pro transformaci pšenice byl použit pTaSS1-as, jak již bylo popsáno výše.

Příklad 7

Komplementace mutanta *E. coli* s klonem cDNA, která kóduje rozpustnou syntázu škrobu z pšenice

Enzymatická aktivita rozpustné syntázy škrobu kódované cDNA klonu TaSS (příklad 2) se analyzovala komplementačními pokusy za použití mutanta *E. coli* Hfr G6MD2 (kmen M. Schwartz, CGSC č. 5080, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, USA) jako hostitele pro genovou expresi. Mutant *E. coli* vykazuje delecii operonu *glg*, kódujícího bakteriální ADP-glukózo-pyrofosforylázu (*glg* C), glykogensyntetázu (*glg* A) a větvicí enzym (*glg* B). Tato mutace má za následek neschopnost syntézy glykogenu drahou vycházející z ADP-glukózy. Kromě toho delecce operonu *mal* A zabraňuje syntéze lineárních α -1,4-glukanů enzymem amylomaltázou (*mal* Q).

Funkčnost rozpustné syntázy škrobu se testovala společnou transformací plazmidů pTaSSSA188 a pACAg v mutantu G6MD2. Plazmid pTaSSSA188 obsahuje nukleotidy 188-2239 se sekvencí cDNA o velikosti 2239 bp, která kóduje rozpustnou syntázu škrobu. cDNA je vložena jako fragment EcoRI/XhoI do oblasti polylinkeru vektoru pBluescript (Stratagene). To umožňuje, že N-koncová část α -peptidu beta-galaktosidázy kódovaná vektorem je fúzována v souladu s čtecím rámcem s částí rozpustné syntázy škrobu.

Úspěšná komplementace mutace glykogensyntetázy (*glg* A) v G6MD2 je závislá na expresi aktivity ADP-glukózo-pyrofosforylázy, zodpovědné za zásobu ADP-glukózy, substrátu pro syntézu α -1,4-glukanů. Tudíž byl společně transformován plazmid pACAG (Abel, G.J.W., Untersuchungen zur Funktion von

Stärke-Synthasen in der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), Dissertation, Freie Universität Berlin, 1995) obsahující kódující oblast lokusu *glg C* izolovanou z kmene *E. coli* LCB 618 (Baecker et al., J. Biol. Chem., 258, 5084-5088, 1983) pod kontrolou promotoru *lacZ*. Kódovaná ADP-glukózo-pyrofosforylázová aktivita je méně ovlivněna aktivátorem fruktózo-1,6-bisfosfátem a inhibítorem AMP, což má za následek dostatečnou zásobu ADP-glukózy.

Buňky společně transformované konstrukty pTaSSSA188 a pACAG byly vysety na misky s LB-agarem doplněným 1% glukózou, 1 mM IPTG a 50 μ M kyselinou diaminopimelovou. Výsledné kolonie byly obarveny jodovými parami. Transformované buňky G6MD2 vykazovaly modrou a světle hnědavou barvu na rozdíl od žlutavé barvy netransformovaných kolonií, což ukazuje, že exprimovaný fúzní protein měl ADP-glukóza: α -1,4-D-glukan 4- α -glukosyltransferázovou aktivitu.

Systém byl kontrolován tím, že buňky G6MD2 kotransformované konstrukty pACAG a pEc5.3 byly barveny jodem. Plazmid pEc5.3 obsahuje gen glykogensyntázy (*glg A*) izolovaný z kmene *E. coli* DH5 α technologií PCR (Abel, G.J.W., Untersuchungen zur Funktion von Stärke-Synthasen in der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), Dissertation, Freie Universität Berlin, 1995). Transformované buňky vykazovaly tmavě modrou barvu po obarvení jodem, což naznačovalo syntézu α -1,4-glukanů.

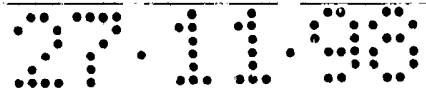
SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

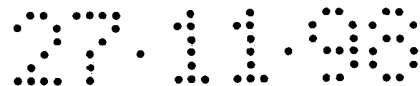
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 2239 párů bazí
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: cDNA k mRNA
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
 (A) ORGANISMUS: Triticum aestivum L.
 (B) KMEN: cv. Florida
 (E) HAPLOTYP: ca. 21 d Caryopses
- (vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:
 (A) KNIHOVNA: cDNA knihovna v pBluescript sk (-)
 (B) KLON: TaSSS
- (ix) ZNAKY:
 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
 (B) POZICE: 3...2017
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I. Č. 1:

CG ACG CAG CCG CCC CTG CCG GAC GCC GGC GTG GGG GAA CTC GCG CCC	47
Thr Gln Pro Pro Leu Pro Asp Ala Gly Val Gly Glu Leu Ala Pro	
1 5 10 15	
GAC CTC CTG CTC GAA GGG ATT GCT GAG GAT TCC ATC GAC AGC ATA ATT	95
Asp Leu Leu Leu Glu Gly Ile Ala Glu Asp Ser Ile Asp Ser Ile Ile	
20 25 30	
GTG GCT GCA AGT GAG CAG GAT TCT GAG ATC ATG GAT GCG AAT GAG CAA	143
Val Ala Ala Ser Glu Gln Asp Ser Glu Ile Met Asp Ala Asn Glu Gln	
35 40 45	
CCT CAA GCT AAA GTT ACA CGT AGC ATC GTG TTT GTG ACT GGT GAA GCT	191
Pro Gln Ala Lys Val Thr Arg Ser Ile Val Phe Val Thr Gly Glu Ala	
50 55 60	
GCT CCT TAT GCA AAG TCA GGG GGG TTG GGA GAT GTT TGT GGT TCG TTA	239

Ala	Pro	Tyr	Ala	Lys	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Cys	Gly	Ser	Leu	
	65					70					75					
CCA	ATT	GCT	CTT	GCT	GCT	CGT	GGT	CAC	CGA	GTG	ATG	GTT	GTA	ATG	CCA	287
Pro	Ile	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	His	Arg	Val	Met	Val	Val	Met	Pro	
80						85				90					95	
AGA	TAC	TTA	AAT	GGG	TCC	TCT	GAT	AAA	AAC	TAT	GCA	AAG	GCA	TTA	TAC	335
Arg	Tyr	Leu	Asn	Gly	Ser	Ser	Asp	Lys	Asn	Tyr	Ala	Lys	Ala	Leu	Tyr	
				100					105					110		
ACT	GCG	AAG	CAC	ATT	AAG	ATT	CCA	TGC	TTT	GGG	GGA	TCA	CAT	GAA	GTG	383
Thr	Ala	Lys	His	Ile	Lys	Ile	Pro	Cys	Phe	Gly	Gly	Ser	His	Glu	Val	
			115					120					125			
ACC	TTT	TTT	CAT	GAG	TAT	AGA	GAC	AAC	GTC	GAT	TGG	GTG	TTT	GTC	GAT	431
Thr	Phe	Phe	His	Glu	Tyr	Arg	Asp	Asn	Val	Asp	Trp	Val	Phe	Val	Asp	
		130					135					140				
CAT	CCG	TCA	TAT	CAC	AGA	CCA	GGA	AGT	TTA	TAT	GGA	GAT	AAT	TTT	GGT	479
His	Pro	Ser	Tyr	His	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Tyr	Gly	Asp	Asn	Phe	Gly	
	145					150					155					
GCT	TTT	GGT	GAT	AAT	CAG	TTC	AGA	TAC	ACA	CTC	CTT	TGC	TAT	GCT	GCA	527
Ala	Phe	Gly	Asp	Asn	Gln	Phe	Arg	Tyr	Thr	Leu	Leu	Cys	Tyr	Ala	Ala	
160					165					170					175	
TGC	GAG	GCC	CCA	CTA	ATC	CTT	GAA	TTG	GGA	GGA	TAT	ATT	TAT	GGA	CAG	575
Cys	Glu	Ala	Pro	Leu	Ile	Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	Tyr	Ile	Tyr	Gly	Gln	
				180					185					190		
AAT	TGC	ATG	TTT	GTT	GTG	AAC	GAT	TGG	CAT	GCC	AGC	CTT	GTG	CCA	GTC	623
Asn	Cys	Met	Phe	Val	Val	Asn	Asp	Trp	His	Ala	Ser	Leu	Val	Pro	Val	
			195					200					205			
CTT	CTT	GCT	GCA	AAA	TAT	AGA	CCA	TAC	GGT	GTT	TAC	AGA	GAT	TCC	CGC	671
Leu	Leu	Ala	Ala	Lys	Tyr	Arg	Pro	Tyr	Gly	Val	Tyr	Arg	Asp	Ser	Arg	
		210					215					220				
AGC	ACC	CTT	GTT	ATA	CAT	AAT	TTA	GCA	CAT	CAG	GGT	GTG	GAG	CCT	GCA	719
Ser	Thr	Leu	Val	Ile	His	Asn	Leu	Ala	His	Gln	Gly	Val	Glu	Pro	Ala	
	225					230					235					
AGT	ACA	TAT	CCT	GAT	CTG	GGA	TTG	CCT	CCT	GAA	TGG	TAT	GGA	GCT	TTA	767
Ser	Thr	Tyr	Pro	Asp	Leu	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu	Trp	Tyr	Gly	Ala	Leu	
240					245					250					255	
GAA	TGG	GTA	TTT	CCA	GAA	TGG	GCA	AGG	AGG	CAT	GCC	CTT	GAC	AAG	GGT	815
Glu	Trp	Val	Phe	Pro	Glu	Trp	Ala	Arg	Arg	His	Ala	Leu	Asp	Lys	Gly	
				260					265					270		
GAG	GCA	GTT	AAC	TTT	TTG	AAA	GGA	GCA	GTT	GTG	ACA	GCA	GAT	CGG	ATT	863
Glu	Ala	Val	Asn	Phe	Leu	Lys	Gly	Ala	Val	Val	Thr	Ala	Asp	Arg	Ile	
			275				280						285			
GTG	ACC	GTC	AGT	CAG	GGT	TAT	TCA	TGG	GAG	GTC	ACA	ACT	GCT	GAA	GGT	911
Val	Thr	Val	Ser	Gln	Gly	Tyr	Ser	Trp	Glu	Val	Thr	Thr	Ala	Glu	Gly	
		290					295					300				



GGA CAG GGC CTC AAT GAG CTC TTA AGC TCC CGA AAA AGT GTA TTG AAT	959
Gly Gln Gly Leu Asn Glu Leu Leu Ser Ser Arg Lys Ser Val Leu Asn	
305 310 315	
GGA ATT GTA AAT GGA ATT GAC ATT AAT GAT TGG AAC CCC ACC ACA GAC	1007
Gly Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile Asn Asp Trp Asn Pro Thr Thr Asp	
320 325 330 335	
AAG TGT CTC CCT CAT CAT TAT TCT GTC GAT GAC CTC TCT GGA AAG GCC	1055
Lys Cys Leu Pro His His Tyr Ser Val Asp Asp Leu Ser Gly Lys Ala	
340 345 350	
AAA TGT AAA GCT GAA TTG CAG AAG GAG TTG GGT TTA CCT GTA AGG GAG	1103
Lys Cys Lys Ala Glu Leu Gln Lys Glu Leu Gly Leu Pro Val Arg Glu	
355 360 365	
GAT GTT CCT CTG ATT GGC TTT ATT GGA AGA CTG GAT TAC CAG AAA GGC	1151
Asp Val Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Tyr Gln Lys Gly	
370 375 380	
ATT GAT CTC ATT AAA ATG GCC ATT CCA GAG CTC ATG AGG GAG GAC GTG	1199
Ile Asp Leu Ile Lys Met Ala Ile Pro Glu Leu Met Arg Glu Asp Val	
385 390 395	
CAA TTT GTC ATG CTT GGA TCT GGG GAT CCA ATT TTT GAA GGC TGG ATG	1247
Gln Phe Val Met Leu Gly Ser Gly Asp Pro Ile Phe Glu Gly Trp Met	
400 405 410 415	
AGA TCT ACC GAG TCG AGT TAC AAG GAT AAA TTC CGT GGA TGG GTT GGA	1295
Arg Ser Thr Glu Ser Ser Tyr Lys Asp Lys Phe Arg Gly Trp Val Gly	
420 425 430	
TTT AGT GTT CCA GTT TCC CAC AGA ATA ACT GCA GGT TGC GAT ATA TTG	1343
Phe Ser Val Pro Val Ser His Arg Ile Thr Ala Gly Cys Asp Ile Leu	
435 440 445	
TTA ATG CCA TCG AGA TTT GAA CCT TGC GGT CTT AAT CAG CTA TAT GCT	1391
Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala	
450 455 460	
ATG CAA TAT GGT ACA GTT CCT GTA GTT CAT GGA ACT GGG GGC CTC CGA	1439
Met Gln Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Gly Thr Gly Leu Arg	
465 470 475	
GAC ACA GTC GAG ACC TTC AAC CCT TTT GGT GCA AAA GGA GAG GAG GGT	1487
Asp Thr Val Glu Thr Phe Asn Pro Phe Gly Ala Lys Gly Glu Glu Gly	
480 485 490 495	
ACA GGG TGG GCG TTC TCA CCG CTA ACC GTG GAC AAG ATG TTG TGG GCA	1535
Thr Gly Trp Ala Phe Ser Pro Leu Thr Val Asp Lys Met Leu Trp Ala	
500 505 510	
TTG CGA ACC GCG ATG TCG ACA TTC AGG GAG CAC AAG CCG TCC TGG GAG	1583
Leu Arg Thr Ala Met Ser Thr Phe Arg Glu His Lys Pro Ser Trp Glu	
515 520 525	



GGG CTC ATG AAG CGA GGC ATG ACG AAA GAC CAT ACG TGG GAC CAT GCC	1631
Gly Leu Met Lys Arg Gly Met Thr Lys Asp His Thr Trp Asp His Ala	
530 535 540	
CCG AGC AGT ACG AGC AGA TCT TCG AGT GGG CCT TCG TGG ACC AAC CCT	1679
Pro Ser Ser Thr Ser Arg Ser Ser Ser Gly Pro Ser Trp Thr Asn Pro	
545 550 555	
ACG TCA TGT AGA CGG GGA CTG GGG AGG TCC AAG TGC GAG TCT CCT TCA	1727
Thr Ser Cys Arg Arg Gly Leu Gly Arg Ser Lys Cys Glu Ser Pro Ser	
560 565 570 575	
GCT CTG AAG ACA TCC TCT TCA TCC TTC CGC GGC CCG GAA GGA TAC CCC	1775
Ala Leu Lys Thr Ser Ser Ser Ser Phe Arg Gly Pro Glu Gly Tyr Pro	
580 585 590	
TGT ACA TTG CGT TGT CCT GCT ACA GTA GAG TCG CAA TGC GCC TGC TTG	1823
Cys Thr Leu Arg Cys Pro Ala Thr Val Glu Ser Gln Cys Ala Cys Leu	
595 600 605	
CTT TGG TTC GCC GGT TCG AGA ACA TAT GAC GGC TGT GCT GCT GCG GCG	1871
Leu Trp Phe Ala Gly Ser Arg Thr Tyr Asp Gly Cys Ala Ala Ala Ala	
610 615 620	
GTG ACA GCT TCG GGT GGA CGA CAG TTA CAG TTT TGG GGA ATA AGG AAG	1919
Val Thr Ala Ser Gly Gly Arg Gln Leu Gln Phe Trp Gly Ile Arg Lys	
625 630 635	
GGA TGT GCT GCA GGA TGG TTA ACA GCA AAG CAC CAC TCA GAT GGC AGC	1967
Gly Cys Ala Ala Gly Trp Leu Thr Ala Lys His His Ser Asp Gly Ser	
640 645 650 655	
CTC TCT GTC CGT GTT ACA GCT GAA ATC AGA AAC CAA CTG GTG ACT CTT TA	2017
Leu Ser Val Arg Val Thr Ala Glu Ile Arg Asn Gln Leu Val Thr Leu	
660 665 670	
GCCTTAGTGA TTGTGAAGTT TGTTGCCTTC TGTGTATGTT GTCTTGTCCT TAGCTGACAA	2077
ATATTTGACC TGTTGGAGAA TTTTATCTTT GCTGCTGTTT TTTTTTAATC AAAAGAGGGG	2137
GTTTCCTCCG ATTTTCATTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	2197
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA	2239

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

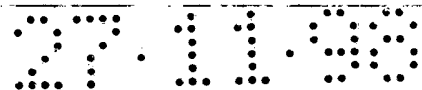
(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 671 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I. Č. 2:

Thr Gln Pro Pro Leu Pro Asp Ala Gly Val Gly Glu Leu Ala Pro Asp
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Glu Gly Ile Ala Glu Asp Ser Ile Asp Ser Ile Ile Val
 20 25 30
 Ala Ala Ser Glu Gln Asp Ser Glu Ile Met Asp Ala Asn Glu Gln Pro
 35 40 45
 Gln Ala Lys Val Thr Arg Ser Ile Val Phe Val Thr Gly Glu Ala Ala
 50 55 60
 Pro Tyr Ala Lys Ser Gly Gly Leu Gly Asp Val Cys Gly Ser Leu Pro
 65 70 75 80
 Ile Ala Leu Ala Ala Arg Gly His Arg Val Met Val Val Met Pro Arg
 85 90 95
 Tyr Leu Asn Gly Ser Ser Asp Lys Asn Tyr Ala Lys Ala Leu Tyr Thr
 100 105 110
 Ala Lys His Ile Lys Ile Pro Cys Phe Gly Gly Ser His Glu Val Thr
 115 120 125
 Phe Phe His Glu Tyr Arg Asp Asn Val Asp Trp Val Phe Val Asp His
 130 135 140
 Pro Ser Tyr His Arg Pro Gly Ser Leu Tyr Gly Asp Asn Phe Gly Ala
 145 150 155 160
 Phe Gly Asp Asn Gln Phe Arg Tyr Thr Leu Leu Cys Tyr Ala Ala Cys
 165 170 175
 Glu Ala Pro Leu Ile Leu Glu Leu Gly Gly Tyr Ile Tyr Gly Gln Asn
 180 185 190
 Cys Met Phe Val Val Asn Asp Trp His Ala Ser Leu Val Pro Val Leu
 195 200 205
 Leu Ala Ala Lys Tyr Arg Pro Tyr Gly Val Tyr Arg Asp Ser Arg Ser
 210 215 220
 Thr Leu Val Ile His Asn Leu Ala His Gln Gly Val Glu Pro Ala Ser
 225 230 235 240
 Thr Tyr Pro Asp Leu Gly Leu Pro Pro Glu Trp Tyr Gly Ala Leu Glu
 245 250 255
 Trp Val Phe Pro Glu Trp Ala Arg Arg His Ala Leu Asp Lys Gly Glu
 260 265 270
 Ala Val Asn Phe Leu Lys Gly Ala Val Val Thr Ala Asp Arg Ile Val
 275 280 285



Thr Val Ser Gln Gly Tyr Ser Trp Glu Val Thr Thr Ala Glu Gly Gly
290 295 300

Gln Gly Leu Asn Glu Leu Leu Ser Ser Arg Lys Ser Val Leu Asn Gly
305 310 315 320

Ile Val Asn Gly Ile Asp Ile Asn Asp Trp Asn Pro Thr Thr Asp Lys
325 330 335

Cys Leu Pro His His Tyr Ser Val Asp Asp Leu Ser Gly Lys Ala Lys
340 345 350

Cys Lys Ala Glu Leu Gln Lys Glu Leu Gly Leu Pro Val Arg Glu Asp
355 360 365

Val Pro Leu Ile Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Tyr Gln Lys Gly Ile
370 375 380

Asp Leu Ile Lys Met Ala Ile Pro Glu Leu Met Arg Glu Asp Val Gln
385 390 395 400

Phe Val Met Leu Gly Ser Gly Asp Pro Ile Phe Glu Gly Trp Met Arg
405 410 415

Ser Thr Glu Ser Ser Tyr Lys Asp Lys Phe Arg Gly Trp Val Gly Phe
420 425 430

Ser Val Pro Val Ser His Arg Ile Thr Ala Gly Cys Asp Ile Leu Leu
435 440 445

Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met
450 455 460

Gln Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Gly Thr Gly Gly Leu Arg Asp
465 470 475 480

Thr Val Glu Thr Phe Asn Pro Phe Gly Ala Lys Gly Glu Glu Gly Thr
485 490 495

Gly Trp Ala Phe Ser Pro Leu Thr Val Asp Lys Met Leu Trp Ala Leu
500 505 510

Arg Thr Ala Met Ser Thr Phe Arg Glu His Lys Pro Ser Trp Glu Gly
515 520 525

Leu Met Lys Arg Gly Met Thr Lys Asp His Thr Trp Asp His Ala Pro
530 535 540

Ser Ser Thr Ser Arg Ser Ser Ser Gly Pro Ser Trp Thr Asn Pro Thr
545 550 555 560

Ser Cys Arg Arg Gly Leu Gly Arg Ser Lys Cys Glu Ser Pro Ser Ala
565 570 575

Leu Lys Thr Ser Ser Ser Ser Phe Arg Gly Pro Glu Gly Tyr Pro Cys
580 585 590

Thr Leu Arg Cys Pro Ala Thr Val Glu Ser Gln Cys Ala Cys Leu Leu
 595 600 605

Trp Phe Ala Gly Ser Arg Thr Tyr Asp Gly Cys Ala Ala Ala Ala Val
 610 615 620

Thr Ala Ser Gly Gly Arg Gln Leu Gln Phe Trp Gly Ile Arg Lys Gly
 625 630 635 640

Cys Ala Ala Gly Trp Leu Thr Ala Lys His His Ser Asp Gly Ser Leu
 645 650 655

Ser Val Arg Val Thr Ala Glu Ile Arg Asn Gln Leu Val Thr Leu
 660 665 670

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 30 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis = „oligonukleotid“

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I. Č. 3:

ACAGGATCCT GTGCTATGCG GCGTGTGAAG 30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 32 párů bazí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: jiná nukleová kyselina

- (A) POPIS: /popis = „oligonukleotid“

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I. Č. 4:

TTGGGATCCG CAATGCCAC AGCATTTC TC 32

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 2825 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA k mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Triticum aestivum L.
- (B) KMEN: cv. Florida
- (E) HAPLOTYP: ca. 21 d Caryopses

(vii) BEZPROSTŘEDNÍ ZDROJ:

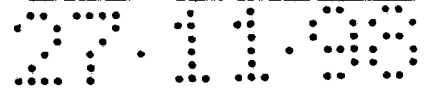
- (A) KNIHOVNA: cDNA knihovna v pBluescript.sk (-)
- (B) KLON: pTASS1

(ix) ZNAKY:

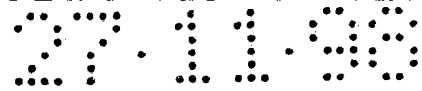
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 162...2559

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I. Č. 5:

CTTCGGCCTG ACCCCGTTTCG TTTACCCCCA CACAGAGCAC ACTCCAGTCC AGTCCAGCCC	60
ACTGCCACCG CGTACTCTC CACTCCCACT GCCACCACCT CCGCCTGCGC CGCGCTCTGG	120
GCGGACCAAC CCGCGAACCG TACCATCTCC CGCCCCGATC C ATG TCG TCG GCG	173
Met Ser Ser Ala	
675	



GTC GCG TCC GCC GCA TCC TTC CTC GCG CTC GCG TCA GCC TCC CCC GGG	221
Val Ala Ser Ala Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser Ala Ser Pro Gly	
680 685 690	
AGA TCA CGC AGG CGG GCG AGG GTG AGC GCG CAG CCA CCC CAC GCC GGG	269
Arg Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Ser Ala Gln Pro Pro His Ala Gly	
695 700 705	
GCC GGC AGG TTG CAC TGG CCG CCG TGG CCG CCG CAG CGC ACG GCT CGC	317
Ala Gly Arg Leu His Trp Pro Pro Trp Pro Pro Gln Arg Thr Ala Arg	
710 715 720	
GAC GGA GCT GTG GCG GCG CTC GCC GCC GGG AAG AAG GAC GCG GGG ATC	365
Asp Gly Ala Val Ala Ala Leu Ala Ala Gly Lys Lys Asp Ala Gly Ile	
725 730 735	
GAC GAC GCC GCC GCG TCC GTG AGG CAG CCC CGC GCA CTC CGC GGT GGC	413
Asp Asp Ala Ala Ala Ser Val Arg Gln Pro Arg Ala Leu Arg Gly Gly	
740 745 750 755	
GCC GCC ACC AAG GTC GCG GAG CGA AGG GAT CCC GTC AAG ACG CTC GAC	461
Ala Ala Thr Lys Val Ala Glu Arg Arg Asp Pro Val Lys Thr Leu Asp	
760 765 770	
CGC GAC GCC GCG GAA GGC GGC GGG CCG TCC CCG CCG GCA GCG AGG CAG	509
Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ala Ala Arg Gln	
775 780 785	
GAC GCC GCC CGT CCG CCG AGT ATG AAC GGC ATG CCG GTG AAC GGC GAG	557
Asp Ala Ala Arg Pro Pro Ser Met Asn Gly Met Pro Val Asn Gly Glu	
790 795 800	
AAC AAA TCT ACC GGC GGC GGC GGC GCG ACT AAA GAC AGC GGG CTG CCC	605
Asn Lys Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys Asp Ser Gly Leu Pro	
805 810 815	
ACG CCC GCA CGC GCG CCC CAT CCG TCG ACC CAG AAC AGA GCA CCG GTG	653
Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Pro Ser Thr Gln Asn Arg Ala Pro Val	
820 825 830 835	
AAC GGT GAA AAC AAA GCT AAC GTC GCC TCG CCG CCG ACG AGC ATA GCC	701
Asn Gly Glu Asn Lys Ala Asn Val Ala Ser Pro Pro Thr Ser Ile Ala	
840 845 850	
GAG GCC GCG GCT TCG GAT TCC GCA GCT ACC ATT TCC ATC AGC GAC AAG	749
Glu Ala Ala Ala Ser Asp Ser Ala Ala Thr Ile Ser Ile Ser Asp Lys	
855 860 865	
GCG CCG GAG TCC GTT GTC CCA GCT GAG AAG ACG CCG CCG TCG TCC GGC	797
Ala Pro Glu Ser Val Val Pro Ala Glu Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly	
870 875 880	
TCA AAT TTC GAG TCC TCG GCC TCT GCT CCC GGG TCT GAC ACT GTC AGC	845
Ser Asn Phe Glu Ser Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser Asp Thr Val Ser	
885 890 895	



GAC GTG GAA CAA GAA CTG AAG AAG GGT GCG GTC GTT GTC GAA GAA GCT 893
Asp Val Glu Gln Glu Leu Lys Lys Gly Ala Val Val Val Glu Glu Ala
900 905 910 915

CCA AAG CCA AAG GCT CTT TCG CCG CCT GCA GCC CCC GCT GTA CAA GAA 941
Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Pro Pro Ala Ala Pro Ala Val Gln Glu
920 925 930

GAC CTT TGG GAT TTC AAG AAA TAC ATT GGT TTC GAG GAG CCC GTG GAG 989
Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys Tyr Ile Gly Phe Glu Glu Pro Val Glu
935 940 945

GCC AAG GAT GAT GGC CGG GCT GTC GCA GAT GAT GCG GGC TCC TTT GAA 1037
Ala Lys Asp Asp Gly Arg Ala Val Ala Asp Asp Ala Gly Ser Phe Glu
950 955 960

CAC CAC CAG AAT CAC GAC TCC GGA CCT TTG GCA GGG GAG AAT GTC ATG 1085
His His Gln Asn His Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly Glu Asn Val Met
965 970 975

AAC GTG GTC GTC GTG GCT GCT GAG TGT TCT CCC TGG TGC AAA ACA GGT 1133
Asn Val Val Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp Cys Lys Thr Gly
980 985 990 995

GGT CTG GGA GAT GTT GCG GGT GCT CTG CCC AAG GCT TTG GCA AAG AGA 1181
Gly Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala Leu Ala Lys Arg
1000 1005 1010

GGA CAT CGT GTT ATG GTT GTG GTA CCA AGG TAT GGG GAC TAT GAA GAA 1229
Gly His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly Asp Tyr Glu Glu
1015 1020 1025

GCC TAC GAT GTC GGA GTC CGA AAA TAC TAC AAG GCT GCT GGA CAG GAT 1277
Ala Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala Ala Gly Gln Asp
1030 1035 1040

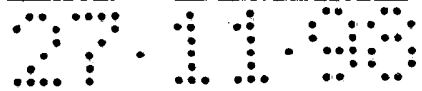
ATG GAA GTG AAT TAT TTC CAT GCT TAT ATC GAT GGA GTT GAT TTT GTG 1325
Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr Ile Asp Gly Val Asp Phe Val
1045 1050 1055

TTC ATT GAC GCT CCT CTC TTC CGA CAC CGT CAG GAA GAC ATT TAT GGG 1373
Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Glu Asp Ile Tyr Gly
1060 1065 1070 1075

GGC AGC AGA CAG GAA ATT ATG AAG CGC ATG ATT TTG TTC TGC AAG GCC 1421
Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu Phe Cys Lys Ala
1080 1085 1090

GCT GTT GAG GTT CCA TGG CAC GTT CCA TGC GGC GGT GTC CCT TAT GGG 1469
Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly Val Pro Tyr Gly
1095 1100 1105

GAT GGA AAT CTG GTG TTT ATT GCA AAT GAT TGG CAC ACG GCA CTC CTG 1517
Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn Asp Trp His Thr Ala Leu Leu
1110 1115 1120



CCT GTC TAT CTG AAA GCA TAT TAC AGG GAC CAT GGT TTG ATG CAG TAC Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp His Gly Leu Met Gln Tyr 1125 1130 1135	1565
ACT CGG TCC ATT ATG GTG ATA CAT AAC ATC GCT CAC CAG GGC CGT GGC Thr Arg Ser Ile Met Val Ile His Asn Ile Ala His Gln Gly Arg Gly 1140 1145 1150 1155	1613
CCT GTA GAT GAA TTC CCG TTC ACC GAG TTG CCT GAG CAC TAC CTG GAA Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr Glu Leu Pro Glu His Tyr Leu Glu 1160 1165 1170	1661
CAC TTC AGA CTG TAC GAC CCC GTG GGT GGT GAA CAC GCC AAC TAC TTC His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His Ala Asn Tyr Phe 1175 1180 1185	1709
GCC GCC GGC CTG AAG ATG GCG GAC CAG GTT GTC GTG GTG AGC CCC GGG Ala Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Gln Val Val Val Val Ser Pro Gly 1190 1195 1200	1757
TAC CTG TGG GAG CTG AAG ACG GTG GAG GGC GGC TGG GGG CTT CAC GAC Tyr Leu Trp Glu Leu Lys Thr Val Glu Gly Gly Trp Gly Leu His Asp 1205 1210 1215	1805
ATC ATA CGG CAG AAC GAC TGG AAG ACC CGC GGC ATC GTC AAC GGC ATC Ile Ile Arg Gln Asn Asp Trp Lys Thr Arg Gly Ile Val Asn Gly Ile 1220 1225 1230 1235	1853
GAC AAC ATG GAG TGG AAC CCC GAG GTG GAC GCC CAC CTC AAG TCG GAC Asp Asn Met Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Asp 1240 1245 1250	1901
GGC TAC ACC AAC TTC TCC CTG AGG ACG CTG GAC TCC GGC AAG CGG CAG Gly Tyr Thr Asn Phe Ser Leu Arg Thr Leu Asp Ser Gly Lys Arg Gln 1255 1260 1265	1949
TGC AAG GAG GCC CTG CAG CGC GAG CTG GGC CTG CAG GTC CGC GCC GAC Cys Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln Val Arg Ala Asp 1270 1275 1280	1997
GTG CCG CTG CTC GGC TTC ATC GGC CGC CTG GAC GGG CAG AAG GGC GTG Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly Gln Lys Gly Val 1285 1290 1295	2045
GAG ATC ATC GCG GAC GCC ATG CCC TGG ATC GTG AGC CAG GAC GTG CAG Glu Ile Ile Ala Asp Ala Met Pro Trp Ile Val Ser Gln Asp Val Gln 1300 1305 1310 1315	2093
CTG GTG ATG CTG GGC ACC GGG CGC CAC GAC CTG GAG AGC ATG CTG CAG Leu Val Met Leu Gly Thr Gly Arg His Asp Leu Glu Ser Met Leu Gln 1320 1325 1330	2141
CAC TTC GAG CGG GAG CAC CAC GAC AAG GTG CGC GGG TGG GTG GGG TTC His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys Val Arg Gly Trp Val Gly Phe 1335 1340 1345	2189

TCC GTG CGC CTG GCG CAC CGG ATC ACG GCG GGG GCG GAC GCG CTC CTC	2237
Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala Asp Ala Leu Leu	
1350 1355 1360	
ATG CCC TCC CGG TTC GAG CCG TGC GGG CTG AAC CAG CTC TAC GCC ATG	2285
Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln Leu Tyr Ala Met	
1365 1370 1375	
GCC TAC GGC ACC GTC CCC GTC GTG CAC GCC GTC GGC GGC CTC AGG GAC	2333
Ala Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly Gly Leu Arg Asp	
1380 1385 1390 1395	
ACC GTG CCG CCG TTC GAC CCC TTC AAC CAC TCC GGG CTC GGG TGG ACG	2381
Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe Asn His Ser Gly Leu Gly Trp Thr	
1400 1405 1410	
TTC GAC CGC GCC GAG GCG CAC AAG CTG ATC GAG GCG CTC GGG CAC TGC	2429
Phe Asp Arg Ala Glu Ala His Lys Leu Ile Glu Ala Leu Gly His Cys	
1415 1420 1425	
CTC CGC ACC TAC CGA GAC TTC AAG GAG AGC TGG AGG GCC CTC CAG GAG	2477
Leu Arg Thr Tyr Arg Asp Phe Lys Glu Ser Trp Arg Ala Leu Gln Glu	
1430 1435 1440	
CGC GGC ATG TCG CAG GAC TTC AGC TGG GAG CAC GCC GCC AAG CTC TAC	2525
Arg Gly Met Ser Gln Asp Phe Ser Trp Glu His Ala Ala Lys Leu Tyr	
1445 1450 1455	
GAG GAC GTC CTC GTC AAG GCC AAG TAC CAG TGG T GAACGCTAGC	2569
Glu Asp Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp	
1460 1465 1470	
TGCTAGCCGC TCCAGCCCCG CATGCGTGCA TGACAGGATG GAACTGCATT GCGCACGCAG	2629
GAAAGTGCCA TGGAGCGCCG GCATCCGCGA AGTACAGTGA CATGAGGTGT GTGTGGTTGA	2689
GACGCTGATT CCAATCCGGC CCGTAGCAGA GTAGAGCGGA GGTATATGGG AATCTTAACT	2749
TGGTATTGTA ATTTGTTATG TTGTGTGCAT TATTACAATG TTGTTACTTA TTCTTGTTAA	2809
AAAAAAAAAA AAAAAA	2825

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 799 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I. Č. 6:

Met Ser Ser Ala Val Ala Ser Ala Ala Ser Phe Leu Ala Leu Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Pro Gly Arg Ser Arg Arg Arg Ala Arg Val Ser Ala Gln Pro
 20 25 30
 Pro His Ala Gly Ala Gly Arg Leu His Trp Pro Pro Trp Pro Pro Gln
 35 40 45
 Arg Thr Ala Arg Asp Gly Ala Val Ala Ala Leu Ala Ala Gly Lys Lys
 50 55 60
 Asp Ala Gly Ile Asp Asp Ala Ala Ala Ser Val Arg Gln Pro Arg Ala
 65 70 75 80
 Leu Arg Gly Gly Ala Ala Thr Lys Val Ala Glu Arg Arg Asp Pro Val
 85 90 95
 Lys Thr Leu Asp Arg Asp Ala Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Pro Pro
 100 105 110
 Ala Ala Arg Gln Asp Ala Ala Arg Pro Pro Ser Met Asn Gly Met Pro
 115 120 125
 Val Asn Gly Glu Asn Lys Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ala Thr Lys Asp
 130 135 140
 Ser Gly Leu Pro Thr Pro Ala Arg Ala Pro His Pro Ser Thr Gln Asn
 145 150 155 160
 Arg Ala Pro Val Asn Gly Glu Asn Lys Ala Asn Val Ala Ser Pro Pro
 165 170 175
 Thr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Ala Ser Asp Ser Ala Ala Thr Ile Ser
 180 185 190
 Ile Ser Asp Lys Ala Pro Glu Ser Val Val Pro Ala Glu Lys Thr Pro
 195 200 205
 Pro Ser Ser Gly Ser Asn Phe Glu Ser Ser Ala Ser Ala Pro Gly Ser
 210 215 220
 Asp Thr Val Ser Asp Val Glu Gln Glu Leu Lys Lys Gly Ala Val Val
 225 230 235 240
 Val Glu Glu Ala Pro Lys Pro Lys Ala Leu Ser Pro Pro Ala Ala Pro
 245 250 255
 Ala Val Gln Glu Asp Leu Trp Asp Phe Lys Lys Tyr Ile Gly Phe Glu
 260 265 270
 Glu Pro Val Glu Ala Lys Asp Asp Gly Arg Ala Val Ala Asp Asp Ala
 275 280 285

Gly Ser Phe Glu His His Gln Asn His Asp Ser Gly Pro Leu Ala Gly
 290 295 300

Glu Asn Val Met Asn Val Val Val Val Ala Ala Glu Cys Ser Pro Trp
 305 310 315 320

Cys Lys Thr Gly Gly Leu Gly Asp Val Ala Gly Ala Leu Pro Lys Ala
 325 330 335

Leu Ala Lys Arg Gly His Arg Val Met Val Val Val Pro Arg Tyr Gly
 340 345 350

Asp Tyr Glu Glu Ala Tyr Asp Val Gly Val Arg Lys Tyr Tyr Lys Ala
 355 360 365

Ala Gly Gln Asp Met Glu Val Asn Tyr Phe His Ala Tyr Ile Asp Gly
 370 375 380

Val Asp Phe Val Phe Ile Asp Ala Pro Leu Phe Arg His Arg Gln Glu
 385 390 395 400

Asp Ile Tyr Gly Gly Ser Arg Gln Glu Ile Met Lys Arg Met Ile Leu
 405 410 415

Phe Cys Lys Ala Ala Val Glu Val Pro Trp His Val Pro Cys Gly Gly
 420 425 430

Val Pro Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Val Phe Ile Ala Asn Asp Trp His
 435 440 445

Thr Ala Leu Leu Pro Val Tyr Leu Lys Ala Tyr Tyr Arg Asp His Gly
 450 455 460

Leu Met Gln Tyr Thr Arg Ser Ile Met Val Ile His Asn Ile Ala His
 465 470 475 480

Gln Gly Arg Gly Pro Val Asp Glu Phe Pro Phe Thr Glu Leu Pro Glu
 485 490 495

His Tyr Leu Glu His Phe Arg Leu Tyr Asp Pro Val Gly Gly Glu His
 500 505 510

Ala Asn Tyr Phe Ala Ala Gly Leu Lys Met Ala Asp Gln Val Val Val
 515 520 525

Val Ser Pro Gly Tyr Leu Trp Glu Leu Lys Thr Val Glu Gly Gly Trp
 530 535 540

Gly Leu His Asp Ile Ile Arg Gln Asn Asp Trp Lys Thr Arg Gly Ile
 545 550 555 560

Val Asn Gly Ile Asp Asn Met Glu Trp Asn Pro Glu Val Asp Ala His
 565 570 575

Leu Lys Ser Asp Gly Tyr Thr Asn Phe Ser Leu Arg Thr Leu Asp Ser
 580 585 590

Gly Lys Arg Gln Cys Lys Glu Ala Leu Gln Arg Glu Leu Gly Leu Gln
 595 600 605
 Val Arg Ala Asp Val Pro Leu Leu Gly Phe Ile Gly Arg Leu Asp Gly
 610 615 620
 Gln Lys Gly Val Glu Ile Ile Ala Asp Ala Met Pro Trp Ile Val Ser
 625 630 635 640
 Gln Asp Val Gln Leu Val Met Leu Gly Thr Gly Arg His Asp Leu Glu
 645 650 655
 Ser Met Leu Gln His Phe Glu Arg Glu His His Asp Lys Val Arg Gly
 660 665 670
 Trp Val Gly Phe Ser Val Arg Leu Ala His Arg Ile Thr Ala Gly Ala
 675 680 685
 Asp Ala Leu Leu Met Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Asn Gln
 690 695 700
 Leu Tyr Ala Met Ala Tyr Gly Thr Val Pro Val Val His Ala Val Gly
 705 710 715 720
 Gly Leu Arg Asp Thr Val Pro Pro Phe Asp Pro Phe Asn His Ser Gly
 725 730 735
 Leu Gly Trp Thr Phe Asp Arg Ala Glu Ala His Lys Leu Ile Glu Ala
 740 745 750
 Leu Gly His Cys Leu Arg Thr Tyr Arg Asp Phe Lys Glu Ser Trp Arg
 755 760 765
 Ala Leu Gln Glu Arg Gly Met Ser Gln Asp Phe Ser Trp Glu His Ala
 770 775 780
 Ala Lys Leu Tyr Glu Asp Val Leu Val Lys Ala Lys Tyr Gln Trp
 785 790 795

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 12 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I. Č. 7:

Pro	Trp	Ser	Lys	Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Asp	Val	Cys
	1				5					10	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 13 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I.Č. 8:

Pro	Ser	Arg	Phe	Glu	Pro	Cys	Gly	Leu	Asn	Gln	Leu	Tyr
	1				5					10		

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 12 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(v) TYP FRAGMENTU: vnitřní

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S I. Č. 9:

Gly	Thr	Gly	Gly	Leu	Arg	Asp	Thr	Val	Glu	Asn	Cys
1					5					10	

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Molekula nukleové kyseliny kódující syntázu škrobu z pšenice, která je vybrána ze skupiny obsahující

a) molekuly nukleové kyseliny kódující protein, který obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci i. č. 2,

b) molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci i. č. 1 nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci,

c) molekuly nukleové kyseliny, které hybridizují s molekulami nukleové kyseliny uvedenými v odstavci a) nebo b) a kódují rozpustnou syntázu škrobu,

d) molekuly nukleové kyseliny, jejichž nukleotidová sekvence se liší od sekvencí molekul nukleové kyseliny v odstavcích a), b) nebo c) díky degeneraci genetického kódu,

e) molekuly nukleové kyseliny kódující protein, který obsahuje sekvenci aminokyselin uvedenou jako sekvenci i. č. 6,

f) molekuly nukleové kyseliny obsahující nukleotidovou sekvenci i. č. 5 nebo odpovídající ribonukleotidovou sekvenci,

g) molekuly nukleové kyseliny, které hybridizují s molekulami nukleové kyseliny uvedenými v odstavci e) nebo f) a

h) molekuly nukleové kyseliny, jejichž nukleotidová sekvence se liší od sekvencí molekul nukleové kyseliny v odstavcích

~~e) až g) díky degeneraci genetického kódu.~~

2. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, která je molekula DNA.

3. Molekula DNA podle nároku 2, která je molekula cDNA.

4. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 1, která je molekula RNA.

5. Molekula nukleové kyseliny, která specificky hybridizuje s řetězcem molekuly nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4.

6. Molekula nukleové kyseliny podle nároku 5, která je oligonukleotid dlouhý alespoň 15 nukleotidů.

7. Vektor obsahující molekulu nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4.

8. Vektor podle nároku 7, kde molekula nukleové kyseliny je spojena v sense orientaci (souhlasné se smyslem transkripce) s regulačním prvky, což zajišťuje transkripci a syntézu translatovatelné RNA v prokaryotických nebo eukaryotických buňkách.

9. Hostitelská buňka, která je transformovaná molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo vektorem podle nároku 7 nebo 8, nebo buňka, která pochází z takové hostitelské buňky.

10. Protein-kódovaný molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4.

11. Způsob přípravy proteinu podle nároku 10 vyznačující se tím, že hostitelská buňka podle nároku 9 se kultivuje v podmínkách, které umožňují syntézu proteinu, a protein se izoluje z kultivovaných buněk a/nebo z kultivačního média.

12. Transgenní rostlinná buňka, která je transformovaná molekulou nukleové kyseliny podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4 nebo vektorem podle nároku 7 nebo 8, nebo buňka pocházející z takové transformované buňky, přičemž molekula nukleové kyseliny kódující rozpustnou syntázu škrobu z pšenice je pod kontrolou regulačních prvků, které dovolují transkripci translatovatelné mRNA v rostlinných buňkách.

13. Rostlina obsahující rostlinné buňky podle nároku 12.

14. Rostlina podle nároku 13, která je užitková rostlina.

15. Rostlina podle nároku 14, která je rostlina ukládající škrob.

16. Rostlina podle nároku 15, která je pšenice.

17. Množitelský materiál z rostliny podle kteréhokoliv z nároků 13 až 16, který obsahuje rostlinné buňky podle nároku 12.

18. Škrob, který je získatelný z rostliny podle kteréhokoliv z nároků 13 až 16 nebo z množitelského materiálu podle nároku 17.

19. Transgenní rostlinná buňka, ve které je snížena aktivita proteinu podle nároku 10.

20. Rostlinná buňka podle nároku 19, kde snížení aktivity v této buňce je dosaženo expresí RNA (anti-sense RNA) s orientací proti smyslu transkriptů molekul DNA podle nároku 1.

21. Rostlina obsahující rostlinné buňky podle nároku 19 nebo nároku 20.

22. Rostlina podle nároku 21, která je užitková rostlina.

23. Rostlina podle nároku 22, která je rostlina ukládající škrob.

24. Rostlina podle nároku 23, která je pšenice.

25. Množitelský materiál z rostliny podle kteréhokoliv z nároků 21 až 24, který obsahuje buňky podle nároku 19 nebo 20.

26. Škrob, který je získatelný z rostlin podle kteréhokoliv z nároků 21 až 24 nebo z množitelského materiálu podle nároku 25.

27. Použití škrobu podle nároku 18 nebo 26 pro výrobu potravin.

28. Použití podle nároku 27, kde potraviny jsou pečivo nebo těstoviny.

29. Použití škrobu podle nároku 18 nebo 26 pro výrobu obalového materiálu nebo výrobků pro jednorázové použití.