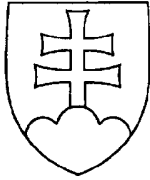


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

- (21) Číslo prihlášky: **64-98**
(22) Dátum podania prihlášky: **18. 7. 1996**
(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **7. 7. 2006**
Vestník ÚPV SR č.: **7/2006**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **95/08979**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **19. 7. 1995**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **FR**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 11. 1998**
Vestník ÚPV SR č.: **11/1998**
(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **19. 6. 2006**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/FR96/01125**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO97/04103**

(11) Číslo dokumentu:

285 144

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.²⁰⁰⁶:

C12N 15/54
C12N 15/82
A01H 5/00

- (73) Majiteľ: **Rhone-Poulenc Agrochimie, Lyon, FR;**
(72) Pôvodca: **Lebrun Michel, Lyon, FR;**
Sailland Alain, Lyon, FR;
Freyssinet Georges, Saint-Cyr-au-Mont-D'Or, FR;
Degryse Eric, Strasbourg, FR;
(74) Zástupca: **Čechvalová Dagmar, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Sekvencia rastlinnej DNA kódujúca mutovanú 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázu, mutovaný rastlinný proteín EPSPS, chimérický gén, vektor, rastlinná bunka, rastlina, spôsob produkcie rastlín a spôsob ošetrovania rastlín**

(57) Anotácia:
Opisuje sa sekvencia rastlinnej DNA kódujúca mutovanú formu enzýmu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázy (skrátene EPSPS), ktorá obsahuje aspoň jednu substitúciu aminokyselín, a to zmenu treonínu za izoleucín v pozícii 102 a substitúciu prolínu za serín v pozícii 106 v sekvencii EPSPS z kukurice a prepožičiava rastline zvýšenú toleranciu proti herbicídum.

SK 285144 B6

Oblasť techniky

Vynález opisuje novú formu enzýmu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázy (skrátene EPSPS), ktorá vykazuje zvýšenú toleranciu proti herbicidom, ktoré sú kompetitívnymi inhibítormi aktivity EPSPS vzhľadom na fosfoenolpyruvát (PEP). Táto odolnejšia forma enzýmu obsahuje najmenej jednu substitúciu aminokyselín, a to zámenu treonínu za izoleucín. Vynález sa ďalej vzťahuje na gén kódujúci tento proteín, na rastlinné bunky transformované chimérickými génovými konštrukciami, ktoré obsahujú tento gén, na regenerované rastliny z týchto buniek a tiež na rastliny, ktoré vznikli krížením s použitím týchto transformovaných rastlín.

Doterajší stav techniky

Glyfosat, sulfosat a fosametin sú širokospektrálne herbicidy, ktoré patria do rodiny fosfometylglycínových herbicidov. Pôsobia v podstate ako kompetitívne inhibítory 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázy (EC 2.5.1.19) alebo EPSPS, vzhľadom na PEP (fosfoenolpyruvát). Po ich aplikácii na rastliny sa tieto herbicidy v rastline lokalizujú v rýchlo rastúcich častiach, osobitne v stonkových a koreňových vrcholoch, kde sa akumulujú a spôsobujú poškodenie, ktoré vedie až k deštrukcii citlivých rastlín.

Plastidová EPSPS, hlavný cieľ týchto herbicidov, je enzým, ktorý sa v metabolizme zúčastňuje biosyntézy aromatických aminokyselín. EPSPS je kódovaná jedným alebo viacerými jadrovými génmi a syntetizovaná vo forme cytoplazmatického prekursoru, ktorý je následne importovaný do plastidov, kde sa enzým akumuluje vo svojej maturovanej forme.

Tolerancia rastlín proti glyfosatu a podobným herbicidom z rovnakej skupiny sa získa začlenením EPSPS génu do ich genómu. Gén je rastlinného alebo bakteriálneho pôvodu a je mutovaný alebo inak pozmenený, a to tak, aby došlo k zmene charakteru inhibície produktu génu glyfosatom. Z hľadiska pôsobenia glyfosatu a stupňa tolerance produktu použitých génov proti glyfosatu, sa ukazuje výhodné, aby bolo možné exprimovať produkt translácie tohto génu tak, aby došlo k jeho akumulácii v dostatočnom množstve priamo v plastidoch.

V US patente 4 535 060 je opisovaná tolerancia rastlín proti spomínaným typom herbicidov, osobitne N-fosfonometylglycínu a glyfosatu, ktorá sa dosiahla zavedením génu kódujúceho EPSPS s najmenej jednou mutáciou do rastlinného genómu. Táto mutácia spôsobila, že zmenený enzým po jeho lokalizácii v plastidovom kompartmente je odolnejší proti jeho inhibítoru (glyfosatu).

Uvedené techniky by však mali byť vylepšené tak, aby sa získala väčšia spoľahlivosť s používaním týchto rastlín v poľnohospodárskych podmienkach.

Podstata vynálezu

V tomto vynáleze sa pod pojmom „rastlina” rozumie každý mnohobunkový organizmus schopný fotosyntézy, a pojmom „rastlinná bunka” sa rozumie každá bunka odvodená od rastliny, schopná tvoriť akékoľvek nediferencované pletivá, ako sú kalusy alebo diferencované pletivá, ako sú embryá, rastlinné časti alebo semená.

Predmetom predkladaného vynálezu je príprava transformovaných rastlín so zvýšenou toleranciou proti herbicidom fosfonometyl-glycínovej skupiny, a to regeneráciou

buniek transformovaných pomocou nových chimérických génov, ktoré obsahujú gén pre toleranciu proti týmto herbicidom.

Predmetom vynálezu je tiež chimérický gén, o ktorom je známe, že v rastlinách zvyšuje toleranciu proti herbicidom s cieľovým pôsobením na EPSPS. Tento gén obsahuje v smere transkripcie po sebe: promótorovú oblasť, voliteľne aj tranzitnú peptidovú oblasť, sekvenciu génu pre toleranciu enzýmu proti glyfosatu a neprekľadanú oblasť s polyadenylačným signálom na 3' konci. Gén pre rezistenciu proti glyfosatu obsahuje v porovnaní s genómom, z ktorého je odvodený, substitúciu treonínu 102 za izoleucín v „aroA” oblasti. Vo výhodnom usporiadaní tento gén obsahuje navyše v rovnakej oblasti substitúciu prolínu 106 za serín. Tieto substitúcie môžu byť vnesené alebo už sú prítomné v EPSPS sekvencii akéhokoľvek pôvodu, osobitne rastlinného či bakteriálneho, alebo v enzýme z rias či húb.

Tranzitné peptidy, ktoré môžu byť použité v tranzitnej peptidovej oblasti, môžu byť rastlinného pôvodu, odvodené napríklad z kukurice, slnečnice, hrachu, tabaku alebo z ďalších ľubovoľných rastlín. Prvý a druhý tranzitný peptid môžu byť identické, podobné alebo rôzne. Ďalej môžu obsahovať jednu alebo viac jednotiek tranzitných peptidov, ako je uvedené v Európskej patentovej prihláške EP 0 508 909. Úlohou tejto charakteristickej oblasti je umožniť uvoľnenie maturovaných a natívnych proteínov s maximálnou účinnosťou, osobitne zmienenej mutovaného EPSPS, v plazmidových kompartmentoch.

Výhodne sa podľa vynálezu promótorová oblasť chimérického génu skladá najmenej z jedného promótoru génu alebo promótorového fragmentu, ktorý je v rastlinných pletivách prirodzene exprimovaný (tubulín, intróny, aktín, histón).

Neprekľadaná oblasť so signálom na termináciu transkripcie na 3' konci chimérického génu môže byť rôzneho pôvodu, napríklad bakteriálneho, ako signál z génu pre nopalín syntázy, alebo rastlinného, ako signál z génu pre histón H4A748 z *Arabidopsis thaliana*, ako je uvedené v Európskej patentovej prihláške 633 317 (European Application 633 317).

Chimérický gén podľa vynálezu môže obsahovať, okrem zmienenej časti, ešte najmenej jednu neprekľadanú spájajúcu oblasť (linker), ktorá môže byť umiestnená medzi dvoma rôznymi transkribovanými oblasťami, ktoré boli opísané skôr. Táto spájajúca oblasť môže byť akéhokoľvek pôvodu, napríklad bakteriálneho, vírusového alebo rastlinného.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Izolácia cDNA kódujúcej kukuričnú EPSPS:

V nasledujúcej časti sú opísané rôzne postupy vedúce ku získaniu cDNA kódujúcej EPSPS z kukurice. Táto cDNA slúži ako základ na vnesenie dvoch mutácií, ako je opísané. Všetky opísané operácie sú opísané formou príkladov a zodpovedajú jednému možnému vybranému spôsobu z mnohých, ktoré vedú k dosiahnutiu rovnakých výsledkov. Tento výber nemá žiadny vplyv na kvalitu výsledkov, a tak možno na dosiahnutie výsledkov použiť akúkoľvek vhodnú metódu, podľa výberu odborníka v danom odbore. Väčšina metód týkajúcich sa molekulového inžinierstva DNA fragmentov je opísaná v „Current Protocols in Molecular Biology” Díel 1 a 2, Ausubel a kolektív, vydané v Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1989) (ďalej uvádzané odkazy na protokoly opísané v tejto práci budú označené skratkou „ref. CPMB”). Operácie

vzťahujúce sa na DNA, ktoré sú uskutočňované podľa protokolov opísaných v tejto práci, sú predovšetkým tieto: ligácia DNA fragmentov, pôsobenie Klenowovho fragmentu DNA polymerázy I a T4DNA polymerázy, príprava plazmidovej DNA a DNA z bakteriofága λ , ďalej tiež minipreparácia a maxipreparácia a analýza RNA a DNA pomocou Southern a Northern hybridizácie. Ďalšie metódy opísané v tejto práci boli uskutočnené podľa uvedených protokolov a len významné modifikácie a dodatky k týmto protokolom sú opísané neskôr.

Príklad 1:

1. Získanie fragmentov EPSPS z *Arabidopsis thaliana* dva 20-mérové oligonukleotidy s nasledovnými sekvenciami:

5'-GCTCTGCTCATGTCTGCTCC-3'
5'-GCCCCCCTTGACAAAGAAA-3'

boli syntetizované podľa sekvencie génu pre EPSPS z *Arabidopsis thaliana* (Klee H. J. a kolektív (1987) Mol. Gen. Genet., 210, strana 437 až 442). Tieto dva oligonukleotidy zodpovedajú pozíciám 1523 až 1543 a 1737 až 1717 podľa publikovanej sekvencie a v opačných orientáciách.

b) Celková DNA z *Arabidopsis thaliana* (var. columbia) bola získaná z firmy Clontech (citácia katalógu: 6970 až 1).

c) 50 nanogramov (ng) DNA sa zmieša s 300 ng každého oligonukleotidu a podrobí sa 35 amplifikačným cyklom v prístroji Perkin-Elmer 9600, s použitím štandardného média na amplifikáciu, ktoré je odporúčané výrobcom. Výsledný fragment s dĺžkou 204-bp tvorí fragment EPSPS z *Arabidopsis thaliana*.

2. Konštrukcia knižnice cDNA z BMS bunkovej línie kukurice

a) 5 g filtrovaných buniek je zhomogenizovaných v kvapalnom dusíku, celkové nukleové kyseliny sú odstránené spôsobom podľa Shura a kolektív, s nasledovnými modifikáciami:

- pH lyzujúceho pufru je upravené na pH 9,0,
- po precipitácii s izopropanolom sa sediment rozpustí vo vode a pridá sa chlorid lítny do koncentrácie 2,5 M. Po dvanásťhodinovej inkubácii pri 0 °C sa sediment získaný centrifugáciou počas 15 minút pri 30.000 g pri 4 °C resolubilizuje. Rozpustený sediment obsahuje RNA frakciu z celkových nukleových kyselín.

b) Poly (A)⁺ RNA frakcia sa získa chromatografiou na oligo (dT)-celulóze kolóny, ako je opísané v „Current Protocols in Molecular Biology“.

c) Syntéza dvojvláknovej cDNA obsahujúcej syntetický EcoRI koniec: táto syntéza sa uskutočňuje podľa protokolu výrobcu dodávajúcim rôzne chemikálie potrebné na túto syntézu vo forme kitov, napríklad - „copy kit“ od firmy InVitrogen.

Dva jednovláknové a čiastočne komplementárne oligonukleotidy nasledujúcich sekvencií:

5'-AATCCCCGGG-3'
5'-CCCGGG-3' (tento oligonukleotid je fosforylovaný)

sa ligujú k tupým koncom dvojvláknovej cDNA.

Výsledkom ligácie adaptorov je vytvorenie SmaI miest pripojených k dvojvláknovej cDNA a kohéznych EcoRI miest na každom konci dvojvláknových cDNA.

Konštrukcia knižnice:

cDNA s umelo vytvorenými kohéznymi EcoRI miestami na koncoch sa liguje s λ gt10 cDNA po štiepení pomocou EcoRI a defosforyláciou podľa protokolu dodávateľa kitu New England Biolabs.

Časť produktov ligačnej reakcie je enkapsidovaná in vitro s enkapsidačnými extraktmi, menovite s Gigapack Gold, podľa inštrukcií dodávateľa. Knižnica je ďalej titrovaná s použitím baktérií *E. coli* C600 hfl. Takto získaná knižnica sa namnoží a skladuje podľa inštrukcií toho istého dodávateľa a obsahuje cDNA knižnicu pre BMS bunkovú suspenziu kukurice.

3. Skrining cDNA knižnice BMS bunkovej suspenzie kukurice pomocou EPSPS sondy z *Arabidopsis thaliana*

Protokol používaný na tento skrining sleduje návody uvedené v „Current Protocols in Molecular Biology“ diel 1 a 2, Ausubel a kolektív, publikovaný v Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1989) (CPMB).

V skratke, približne 10⁶ rekombinantných fágov sa vyseje pri priemernej hustote 100 fágov na cm² na LB misky. Lytické plaky sa replikujú na membrány Amersham Hybond N ako duplikáty.

DNA sa fixuje na filtre pomocou pôsobenia 1600 kJ UV (Stratagene Stratalinker). Filtre sa prehybridizujú v 6xSSC/ 0,1 % SDS/ 0,25 % odtučené mlieko počas dvoch hodín pri 65 °C. Hybridizačná sonda pre EPSPS z *Arabidopsis thaliana* bola označená s [³²P]dCTP metódou náhodných primerov podľa návodu dodávateľa kitu (Pharmacia Ready to Go kit). Získaná špecifická aktivita je rádovo 10⁸ cpm na μ g fragmentu. Po denaturácii trvajúcej 5 minút pri 100 °C sa sonda pridá do prehybridizačného média a hybridizácia pokračuje ďalších 14 hodín pri 55 °C. Filtre autorádiografované po 48 hodín trvajúcej expozícii pri -80 °C na film Kodak XAR5 a s použitím kazety so zosilňovačom signálu Amersham Hyperscreen RPN. Porovnanie pozitívnych škvŕn na filteri s miskami, z ktorých boli replikované, umožní zistiť fágy zodpovedajúce pozitívnym hybridizačným signálom s EPSPS sondou z *Arabidopsis thaliana*. Tieto kroky odobratia z kultivačných platiní, vysiatia, prenosu, hybridizácie a opätovného získavania sú opakované dovtedy, pokiaľ všetky škvŕny na miske z úspešne purifikovaných fágov nie sú pri hybridizácii 100 % pozitívne. Jednotlivé plaky z fágového lyzátu sú prenesené do riediaceho média λ (Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgSO₄, 0,1 M NaCl, 0,1 % želatína). Tieto fágy tvoria v roztoku EPSPS-pozitívne klony BMS bunkovej suspenzie kukurice.

4. Príprava a analýza DNA z EPSPS klonov BMS bunkovej suspenzie kukurice

Približne 5x10⁸ fágov sa pridá ku 20 ml baktérií C600 hfl s optickou hustotou OD_{600nm} = 2/ml a inkubuje sa 15 minút pri 37 °C. Táto suspenzia sa nariedi do 200 ml bakteriálneho rastového média v 1 l Erlenmayerových bankách a mieša sa na rotačnej trepačke pri 250 rpm. Lýza je zjavná, keď sa médium začne číriť, čo zodpovedá lýze turbídnych baktérií a prejavuje sa približne po 4 hodinách miešania. S týmto supernatantom sa zaobchádza podľa inštrukcií opísaných v „Current Protocols in Molecular Biology“. Získaná DNA zodpovedá EPSPS klonom bunkovej suspenzie kukurice BMS.

Jeden až dva mikrogramy tejto DNA sa štiepia s EcoRI a delia sa v 0,8 % LGTA/TBE agarózovom géli (ref. CPMB).

Konečné overenie je založené na kontrole toho, že purifikovaná DNA vykazuje hybridizačný signál s EPSPS sondou z *Arabidopsis thaliana*. Po elektroforéze sú fragmenty DNA prenesené na membrány Amersham Hybond N podľa protokolu opisujúceho Southern blotting a opísaného „Current Protocols in Molecular Biology”. Tento filter sa hybridizuje so sondou EPSPS z *Arabidopsis thaliana* podľa opísaných podmienok v sekcii 3. Klon, ktorý vykazuje hybridizačný signál s touto sondou pre EPSPS z *Arabidopsis thaliana* a obsahujúci najdlhší EcoRI fragment by mal mať odhadovanú veľkosť na géli približne 1,7 kbp.

5. Získanie klonu pRPA-ML-711

Desať mikrogramov klonu fága obsahujúceho 1,7 kbp dlhý inzert sa podrobí pôsobeniu restriktčného enzýmu EcoRI a rozdelí sa v 0,8 % LGTA/TBE agarózovom géli (ref. CPMB). Časť gélu s 1,7 kbp dlhým inzertom sa vyreže z gélu po vyfarbení pomocou BET a fragment sa opracuje agarózou podľa inštrukcií dodávateľa, New England Biolabs. Purifikovaná DNA získaná z fragmentu 1,7 kbp sa lihuje pri 12 °C počas 14 hodín s DNA plazmidom pUC19 (New England Biolabs) naštípeným pomocou restriktčného enzýmu EcoRI podľa protokolu na ligáciu opísaného v „Current Protocols in Molecular Biology”. Dva mikrolitre zmienenej ligačnej zmesi boli použité na transformáciu časti elektrokompetentných buniek *E. coli* DH10B, transformácia sa uskutočňuje elektroporáciou pri nasledovných podmienkach: zmes kompetentných baktérií a ligačné médium sa prenesie do elektroporačnej kyvety s hrúbkou 0,2 cm (Biorad), ktorá sa predtým vychladí na 0 °C. Fyzikálne podmienky elektroporácie pri použití elektroporátora vyrobeného firmou Biorad sú nasledovné: 2500 V, 25 µF a 200 Ω. Za týchto podmienok je stredná doba vybitia kondenzátora rádovo 4,2 milisekundy. Baktérie sa následne prenesú do 1 ml SOC média (ref. CPMB) a miešajú sa jednu hodinu pri 200 rpm na rotačnej trepačke v pätnástimililitrových skúmavkách Corning. Po vysiati na LB/agarové médium, do ktorého je pridaný karbenicillin do 100 µg/ml, sa uskutoční minipreparácia bakteriálnych klonov, ktoré narástli cez noc pri 37 °C. Minipreparácia sa uskutočňuje podľa návodu opísaného v „Current Protocols in Molecular Biology”. Po naštípení DNA s enzýmom EcoRI a separácii elektroforézou v 0,8 % LGTA/TBE agarózovom géli (ref. CPMB) sa vyberú klony s 1,7-kbp dlhým inzertom. Konečné overenie sa skladá z kontroly toho, že purifikovaná DNA skutočne vykazuje hybridizačný signál s EPSPS sondou z *Arabidopsis thaliana*. Po elektroforéze sa DNA fragmenty prenesú na membrány Amersham Hybond N tak, ako je to opísané v návode na Southern blotting v „Current Protocols in Molecular Biology”.

Filter sa hybridizujú s EPSPS sondou z *Arabidopsis thaliana* podľa podmienok opísaných v sekcii 3. Plazmid s 1,7-kbp dlhým klonovaným inzertom a hybridizujúci s EPSPS sondou z *Arabidopsis thaliana* bol pripravený vo väčšom množstve a výsledná DNA bola purifikovaná z baktérií na gradiente CsCl, ako je opísané v „Current Protocols in Molecular Biology”. Purifikovaná DNA bola čiastočne sekvenovaná pomocou Pharmacia kitu podľa návodu výrobcu a s použitím primerov, ako sú M13 priamy a spätočný (reverzný) univerzálny primer, ktoré sú dodávané rovnakým výrobcom. Čiastočná sekvencia pokrýva približne 0,5 kbp. Odvodená aminokyselinová sekvencia v oblasti

maturovaného proteínu (približne 50 aminokyselinových zvyškov) vykazuje 100 % totožnosť so zodpovedajúcou aminokyselinovou sekvenciou maturovanej kukuričnej EPSPS opísanej v Americkom patente USP 4 971 908. Tento klon zodpovedajúci 1,7-kbp EcoRI fragmentu EPSPS DNA z BMS bunkovej suspenzie kukurice, bol označený ako pRPA-ML-711. Kompletná sekvencia tohto klonu bola určená sekvenovaním oboch vláken s použitím postupu podľa Pharmacia kitu a syntetizovaním komplementárnych oligonukleotidov k týmto vláknam, ale opačne orientovaným, približne pre každých 250 bp. Kompletná sekvencia získaného 1713-bp dlhého klonu je uvedená v Sekvencii id. č. 1.

6. Získanie klonu pRPA-ML-715

Analýza sekvencie klonu pRPA-ML-711, a najmä porovnanie odvodennej aminokyselinovej sekvencie so zodpovedajúcou sekvenciou z kukurice, vykazuje predĺženie sekvencie o 92 bp proti smeru transkripcie od GCG kodónu kódujúceho NH₂-koncový alanín maturovanej časti kukuričnej EPSPS (Americký patent USP 4 971 908). Podobne je pozorované predĺženie sekvencie o 288 bp v smere transkripcie od AAT kodónu kódujúceho COOH-koncový asparagín maturovanej kukuričnej EPSPS (Americký patent USP 4 971 908). Tieto dve časti by mohli zodpovedať v prípade predĺženia NH₂ konca, časti sekvencie tranzitného génu pre lokalizáciu v plastide a v prípade COOH-konca, neprekladanej 3' oblasti DNA.

V prípade získania cDNA kódujúcej maturovanú časť kukuričnej EPSPS, ako je opísané v USP 4 971 908, sú uskutočnené nasledovné operácie:

Odstránenie 3' neprekladanej oblasti: konštrukcia pRPA-ML-712:

Klon pRPA-ML-711 bol štiepený s restriktčným enzýmom AseI. Na výsledné získané štepy sa pôsobilo Klenowovým fragmentom DNA polymerázy I podľa protokolu opísaného v CPMB. Tak boli získané tupé konce. Produkt bol následne štiepený s restriktčným enzýmom SacII. Výsledná DNA bola delená elektroforézou v 1 % LGTA/TBE agarózovom géle (ref. CPMB).

Časť gélu obsahujúca inzert s veľkosťou 0,4-kbp, so zarovnaným koncom po pôsobení restriktčného enzýmu AseI a siahajúca až po miesto štiepenia enzýmu SacII, bola vyrezaná z gélu a purifikovaná podľa protokolu uvedeného v odseku 5. DNA získaná z klonu pRPA-ML-711 bola podrobená restriktčnému štiepeniu s enzýmom HindIII v mieste HindIII ležiacom v polylinkeri klonovaného vektora pUC19. Presahujúce konce vzniknuté týmto štiepením boli Klenowovým fragmentom DNA polymerázy I zarovnané na tupé. Ďalej nasledovalo štiepenie restriktčným enzýmom SacII. DNA vzniknutá touto manipuláciou bola delená pomocou elektroforézy v 0,7 % LGTA/TBE agarózovom géli (ref. CPMB).

Časť gélu obsahujúca fragment s približnou veľkosťou 3,7-kbp s tupými koncami po štiepení restriktčným enzýmom HindIII a siahajúca až po štiepne miesto pre restriktčný enzým SacII bola vyrezaná z gélu a purifikovaná podľa protokolu opísaného v odseku 5.

Tieto dva inzerty boli ligáciou spojené a 2 µl ligačnej zmesi boli použité na transformáciu *E. coli* DH10B, ako už bolo opísané v odseku 5.

Obsah plazmidovej DNA z rôznych kmeňov bol analyzovaný podľa postupu opísaného pre pRPA-ML-711. Jeden z vybraných plazmidových klonov obsahuje približne 1,45-

-kbp dlhý EcoRI-HindIII inzert. Sekvenovaním terminálnych koncov tohto klonu sa potvrdilo, že 5' koniec inzertu presne zodpovedá korešpondujúcemu koncu pRP-ML-711 a 3' koniec má nasledujúcu sekvenciu:

5'-...AATTAAGCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATG-CAAGCTT-3'

Podčiarknutá sekvencia zodpovedá kodónu pre COOH-koncovú aminokyselinu asparagín, nasledujúci kodón zodpovedá translačnému stop kodónu.

Nukleotidová sekvencia v smere transkripcie zodpovedá sekvencii časti polylinkera pUC19. Tento klon obsahuje sekvenciu zodpovedajúcu sekvencii pRPA-ML-711 až po miesto na termináciu translácie maturovanej kukuričnej EPSP syntázy. Za týmto miestom nasleduje sekvencia polylinkera pUC19 až po miesto HindIII. Celá táto konštrukcia sa nazýva pRPA-ML-712.

Modifikácia 5'konca pRPA-ML-712: konštrukcia pRPA-ML-715:

Klon pRPA-ML-712 bol štiepený restriktívnymi enzýmami PstI a HindIII. Z týchto manipulácií vzniknutá DNA bola separovaná pomocou elektroforézy na 0,8 % LGTA/TBE agarózovom géli (ref. CPMB). Časť gélu obsahujúca PstI-EcoRI inzert s veľkosťou 1,3-kbp bola vyrezaná z gélu a purifikovaná podľa návodu uvedeného v odseku 5.

Inzert bol ligovaný za prítomnosti ekvimolárnych množstiev každého z dvoch čiastočne komplementárnych oligonukleotidov s nasledujúcimi sekvenciami:

Oligo1: 5'- GAGCCGAGCTCCATGGCCGGCGCCGAG-GAGATGGTGTGCA - 3

Oligo2: 5'- GCACGATCTCCTCGGCGCCGGCCATGG-AGCTCGGCTC - 3

a tiež v prítomnosti DNA plazmidu pUC19 štiepenej s restriktívnymi enzýmami BamHI a HindIII.

Dva mikrolitre ligačnej zmesi boli použité na transformáciu E. coli DH10B, ako je opísané v odseku 5. Po analýze obsahu plazmidovej DNA v rôznych klonoch, ktorá bola uskutočnená podľa návodu v časti 5, bolo zistené, že jeden klon obsahuje inzert s približne 1,3-kbp dlhou sekvenciou. Tento bol podrobený ďalšej analýze. Sekvencia 5' konca vybraného klonu sa skladá z nasledujúcich častí: sekvencia polylinkera, a to od štiepneho miesta pre EcoRI až po miesto štiepenia BamHI, potom nasleduje sekvencia oligonukleotidov použitých na klonovanie, ďalej nasleduje zvyšok sekvencie nachádzajúci sa v pRPA-ML-712. Tento klon bol označený pRPA-ML-713. V tomto klone je kodón ATG pre metionín zahrnutý do väzbového miesta pre restriktívny enzým NcoI, a to proti smeru transkripcie N-koncového časti kodónu pre alanín maturovanej EPSP syntázy. Ďalšie kodóny pre alanín a glycín nachádzajúce sa na N-konci, sú zachované, ale sú modifikované na tretej variabilnej báze: počiatočný GCGGGT dáva po modifikácii GCCGGC.

Klon pRPA-ML-713 bol štiepený restriktívnym enzýmom HindIII. Na získané výsledné štepy sa pôsobilo Klenowovým fragmentom DNA polymerázy I. DNA bola potom podrobená restriktívnemu štiepeniu s enzýmom SacI. Výsledná DNA bola delená elektroforézou v 0,8 % LGTA/TBE agarózovom géli (ref. CPMB).

Časť gélu obsahujúca inzert s veľkosťou 1,3-kbp „HindIII-tupý koniec/SacI“ bola vyrezaná z gélu a purifikovaná podľa protokolu uvedeného v odseku 5. Tento inzert bol ligovaný za prítomnosti DNA z plazmidu pUC19, ktorá bola štiepená s restriktívnym enzýmom XbaI a prečnievajúce konce vzniknuté týmto štiepením boli zarovnané pomocou Klenowovho fragmentu DNA polymerázy I. Výsledný produkt bol štiepený s restriktívnym enzýmom SacI.

2 µl ligačnej zmesi boli použité na transformáciu E. coli DH10B, ako je opísané v odseku 5. Po analýze plazmidovej DNA z rôznych klonov, ktorá bola uskutočnená podľa návodu v časti 5, bolo zistené, že jeden klon má inzert s približne 1,3-kbp sekvenciou. Tento bol podrobený ďalšej analýze. Sekvencia DNA koncových častí tohto vybraného klonu sa skladá z nasledovných častí: sekvencia pUC19 polylinkera, a to od štiepiaceho miesta pre EcoRI až po miesto SacI štiepenia, potom nasleduje sekvencia oligonukleotidov použitých na klonovanie, z ktorých bola vynechaná sekvencia s dĺžkou 4 bp GATC z oligonukleotidu I opísaného skôr. Ďalej nasleduje zostávajúca sekvencia prítomná v pRPA-ML-712 až po miesto štiepenia pre HindIII a sekvencia polylinkera pUC19 od miesta pre XbaI po miesto pre HindIII. Tento klon bol označený pRPA-ML-715.

Príprava cDNA kódujúcej mutovanú formu kukuričnej EPSPS.

Všetky kroky vedúce k mutagenéze boli uskutočnené pomocou súpravy Pharmacia U.S.E. podľa inštrukcií dodávateľa. Princíp tohto systému na generovanie mutácií je nasledovný: plazmidová DNA sa teplotne denaturuje a reasociuje sa v molárnom nadbytku oligonukleotidov, ktorý má eliminovať unikátne cieľové miesto pre ten restriktívny enzým, ktorý sa vyskytuje v polylinkeri. Po reasociácii sa nasyntetizuje komplementárne vlákno pomocou T4 DNA polymerázy v prítomnosti T4 DNA ligázy a proteínu génu 32 vo vhodnom pufrí, ktorý je dodávaný výrobcom. Produkt syntézy je inkubovaný v prítomnosti restriktívneho enzýmu, ktorého cieľové sa malo mutagenézou odstrániť. Ako hostiteľské bunky na transformáciu touto DNA sa použijú baktérie E. coli, predovšetkým však také kmene, ktoré obsahujú mutáciu mutS.

Bunky sa nechajú rásť v kvapalnom médiu, celková plazmidová DNA sa z nich purifikuje a tá sa potom inkubuje s uvedeným restriktívnym enzýmom. Potom sa ako hostiteľ na transformáciu touto DNA použijú baktérie kmeňa E. coli DH10B. Vyizoluje sa plazmidová DNA jednotlivých klonov a sekvenovaním sa otestuje prítomnosť mutácie.

A)- modifikácia cieľových miest alebo sekvencie, bez významného zásahu do charakteru rezistencie kukuričnej EPSPS proti produktom metabolizmu, ktoré sú zároveň kompetitívnymi inhibítormi EPSP syntázy: vynechanie cieľového miesta pre NcoI z plazmidu pRPA-ML-715.

Sekvencia plazmidu pRPA-ML-715 bola očíslovaná tak, že ako začiatok bol určená prvá báza N-koncového alanínového kodónu GCC. Táto sekvencia obsahuje cieľové miesto NcoI v pozícii 1217. Oligonukleotid určený na modifikáciu cieľového miesta má sekvenciu:

5'-CCACAGGATGGCGATGGCCTTCTCC-3'.

Vlastné sekvenovanie sa uskutočnilo postupom uvedeným v referenciách a pritom sa zistilo, že po mutagenéze sekvencia zodpovedá použitému oligonukleotidu. Cieľové

miesto NcoI bolo skutočne odstránené a translácia aminokyselín v tejto oblasti zachováva začiatočnú sekvenciu podľa plazmidu pRPA-ML-715.

Tento klon bol označený ako pRPA-ML-716. 1340 bp dlhá sekvencia tohto klonu je znázornená v Sekvencii id. č.: 2 a v Sekvencii id. č.: 3.

B)- modifikácia sekvencie génu zvyšujúceho rezistenciu kukuričnej EPSPS proti metabolickým produktom, ktoré sú zároveň kompetitívnymi inhibítormi EPSP syntázy.

Na vnesenie mutácií sa použili nasledovné nukleotidy:

a) na vnesenie mutácie Thr 102 → Ile
5'-GAATGCTGGAATCGCAATGCGGCCATTGACAGC-3'

b) na vnesenie mutácie Pro 106 → Ser
5'-GAATGCTGGAATCGCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

c) na vnesenie mutácií Gly 101 → Ala a Thr 102 → Ile
5'-CTTGGGAATGCTGCCATCGCAATGCGGCCATTG-3'

d) na vnesenie mutácie Thr 102 → Ile a Pro 106 → Ser
5'-GGGGAATGCTGGAATCGCAATGCGGTCCTTGACAGC-3'

Po sekvenovaní sa zistilo, že sekvencia troch mutovaných fragmentov zodpovedala DNA sekvencii pôvodného klonu pRPA-ML-716, s výnimkou oblastí s cieľenou mutáciou, ktoré zodpovedali použitým oligonukleotidom. Jednotlivé klony boli označené takto: klon s mutáciou Thr 102 → Ile ako pRPA-ML-717, klon s mutáciou Pro 106 → Ser ako pRPA-ML-718, klon s mutáciami Gly 101 → Ala a Thr 102 → Ile ako pRPA-ML-719 a konečne klon s mutáciami Thr 102 → Ile a Pro 106 → Ser ako pRPA-ML-720.

1340-bp dlhá sekvencia plazmidu pRPA-ML-720 je znázornená na sekvencii id. č.: 4 a Sekvencii id. č.: 5.

1395-bp dlhý inzert NcoI-HindIII je základom pre všetky konštrukcie použité na transformáciu rastlín a zamerané na vloženie génov pre rezistenciu proti herbicídum, ktoré fungujú ako inhibítory EPSPS. Vo výhodnom usporiadaní vynálezu sú tieto konštrukcie použité na vnesenie génu rezistencie proti glyfosatu. Tento inzert bude ďalej označovaný ako „dvojité mutant kukuričnej EPSPS“.

Príklad 2: In vitro tolerancia rôznych mutantov proti glyfosatu

2.a: Extrakcia EPSP syntázy

Rôzne gény pre EPSP syntázu sa pomocou NcoI-HindIII kazety vložia do plazmidového vektora pTrec99a (Pharmacia, ref. č.: 27-5007-01), ktorý bol predtým naštiepený s enzýmami NcoI a HindIII. Rekombinantné baktérie kmeňa *E. coli* DH10B exprimujúce tieto rôzne EPSP syntázy sa homogenizujú ultrazvukom v 40 ml pufru na 10 g usadených buniek a potom sa rovnakým pufrum premyjú (200 mM Tris-HCl pH 7,8, 50mM merkaptóetanol, 5 mM EDTA a 1 mM PMSF), do ktorého sa pridá 1 g polyvinylpyrrolidónu (PVP). Suspenzia sa 15 minút mieša pri teplote 4 °C a potom sa 20 minút centrifuguje pri 27,000xg pri 4 °C.

K supernatantu sa pridá síran amónny za vzniku roztoku so 40 % nasýtením síranu amónneho. Zmes sa 20 minút centrifuguje pri 27,000xg pri 4 °C. Potom sa pridá k novému

supernatantu ďalší síran amónny do 70 % nasýtenia. Zmes sa potom 30 minút centrifuguje pri 27,000xg pri 4 °C. EPSP syntáza nachádzajúca sa v proteínovom sedimente sa preniesie do 1 ml pufru (20 mM Tris-HCl, pH 7,8 a 50 mM merkaptóetanol). Tento roztok sa cez noc dialyzuje proti 2 litrom tohto pufru pri teplote 4 °C.

2.b: Enzymová aktivita

Aktivita jednotlivých enzýmov, ako aj ich rezistencie proti glyfosatu, sa meria in vitro počas 10 minút pri teplote 37 °C v reakčnej zmesi obsahujúcej 100 mM kyselinu maleinovou pH 5,6, 1 mM fosfoenolpyruvát, 3 mM šikimát-3-fosfát (pripravený podľa práce Knowles P. F. a Sprinson D. B. 1970, *Methods in Enzymology* 17A, strany 351 až 352, pomocou kmeňa baktérii *Aerobacter aerogenes* ATCC 25597) a 10 mM fluorid draselný. Ako posledný, po prídavku glyfosatu v rozsahu 0 až 20 mM, sa k reakčnej zmesi pridá enzymový extrakt.

Enzymová aktivita sa zmeria na základe uvoľneného fosfátu s použitím techniky opísanej v práci Tausky H. A. a Shorr E. 1953, *J. Biol. Chem.* 202, strany 675 až 685.

Za uvedených podmienok je enzým divého typu (WT) pri 0,12 mM koncentrácii glyfosatu inhibovaný do 85 %. Pri rovnakej koncentrácii glyfosatu je mutantný enzým, označený ako Ser106 inhibovaný iba do 50 % a ďalšie tri mutantné enzýmy Ile102, Ile102/Ser106 a Ala101/Ile102 vykazujú nepatrnú alebo dokonca žiadnu inhibíciu.

Koncentrácia glyfosatu sa musí zvýšiť desaťnásobne, t. j. na 1,2 mM, aby bola dosiahnutá 50 % inhibícia mutantného enzýmu Ile102, pričom mutantné enzýmy Ile102/Ser106, Ala/Ile a Ala ešte stále nevykazujú známky inhibície.

Je treba poznamenať, že aktivita mutantných enzýmov Ala/Ile a Ala nie je ovplyvnená ani pri 10 mM koncentrácii glyfosatu, a že mutantný enzým Ile102/Ser106 nie je nijako dotknutý ani po zdvojnásobení koncentrácie glyfosatu (to jest pri 20 mM).

Príklad 3: Rezistencia transformovaného tabaku

1.1. Transformácia

Vektor pRPA-ML-173 bol vložený do kmeňa baktérii *Agrobacter tumefaciens* EHA101 (Hood a kolektív, 1987) obsahujúceho kozmid pTVK291 (Komari a kolektív, 1986). Transformačná technika je založená na postupu Horshe a kolektív (1985).

1.2. Regenerácia

Regenerácia tabaku PBD6 (dodaného firmou SEITA, Francúzsko) z listových explantátov sa uskutočňuje na báznom médiu Murashige-Skoog (MS) obsahujúcom 30 g/l sacharózy a 200 µg/ml kanamycínu. Explantáty sa odoberú z rastlín pestovaných v skleníku alebo in vitro a odrezky listov sa transformujú štandardným spôsobom (Science, 1985, zväzok 227, strany 1229 až 1231) v troch po sebe idúcich stupňoch: prvý je indukcia výhonkov na kompletnom médiu 30 g/l sacharóza s prídavkom 0,05 mg/l naftyl-octovej kyseliny (NAA) a 2 mg/l benzylaminopurínu (BAP). V tomto médiu sa listové disky inkubujú 15 dní. Výhonky, ktoré vzniknú počas tejto doby, sa následne 10 dní vyvíjajú na MS médiu doplnenom s 30 g/l sacharózy, ale bez prídavkov hormónov. Vyvinuté sa potom vyberú a kultivujú sa na MS médiu na tvorbu koreňov, ktoré má polovičný obsah solí, vitamínov a cukrov a neobsahuje žiadne hormóny. Po približne 15 dňoch sa zakorenené výhonky presadia do pôdy.

1.3. Rezistencia proti 1-3-glyfosatu

Dvadsať transformovaných rastlín, ktoré boli použité na konštrukciu pRPA-ML-173, bolo regenerovaných a presadených do skleníka. Tieto rastliny boli v skleníku ošetrované v štádiu piateho listu vodnou suspenziou herbicidu Round-up, čo zodpovedá použitiu 0,8 kg aktívnej substancie (glyfosatu) na 1 hektár pôdy.

Výsledky zodpovedajú pozorovaniam fytotoxicity zaznamenaným po 3 týždňoch po ošetrovaní. Pri týchto podmienkach bolo dokázané, že rastliny transformované konštrukciou pRPA-ML-173 vykazujú veľmi dobrú mieru tolerance, zatiaľ čo netransformované kontrolné rastliny boli úplne zničené.

Tieto výsledky jasne dokazujú zlepšenie spôsobené použitím chimérmého génu podľa vynálezu.

Príklad 4: Transformácia kukurice a výber buniek kukurice

Bunky kukurice odrody BMS (Black Mexican Sweet) v exponenciálnej fáze rastu boli ošetrované konštrukciou pRPA-RD-130 postupom opísaným Kleinom a kolektív, 1987 (Klen T. M., Wolf E. D., Wu R. a Sanford J. C. (1987): High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Vysokorychlostné mikroprojektily vhodné na vnesenie nukleových kyselín do živých buniek, Nature, zv. 327, strany 70 až 73).

Dva dni po transformácii sa prenesú do rovnakého média s obsahom 2 mM N-(fosfonomethyl)-glycínu. Po osemtyždňovej selekcii na tomto médiu boli vybrané vyvinuté kalusy a pomocou PCR v nich bola dokázaná prítomnosť chimérmého génu OTP-EPSPS.

Bunky, ktoré neboli transformované, ale boli pestované na tých istých médiách s obsahom 2 mM N-(fosfonomethyl)glycínu, sú herbicidom blokováné a nevyvinú sa z nich žiadne kalusy.

Transformované rastliny podľa vynálezu môžu byť použité ako rodičovské rastliny na získavanie línií a hybridov s fenotypom zodpovedajúcim expresii vloženého chimérmého génu.

Opis konštrukcie plazmidov

Plazmid pRPA-RD-124: polyadenylačný signál „nos“ bol vložený do plazmidu pRPA-ML-720 za vzniku klonovacej kazety obsahujúcej dvojnásobný mutant kukuričného génu EPSPS (Thr102→Ile a Pro106→Ser). Plazmid pRPA-ML-720 bol naštiepený s restriktívnym enzýmom HindIII a opracovaný s Klenowovým fragmentom DNA polymerázy I za vzniku tupých koncov. Druhé štiepenie bolo uskutočnené s enzýmom NcoI a potom bol EPSPS fragment purifikovaný. Gén EPSPS bol následne ligovaný s purifikovaným plazmidom pRPA-RD-12 (klonovacia kazeta obsahujúca polyadenylačný signál nopalín syntázy) za vzniku plazmidu pRPA-RD-124. Použiteľný, prečistený vektor pRPA-RD-12 bol získaný tak, že plazmid bol najskôr naštiepený s restriktívnym enzýmom Sall, konce zarovnané s Klenowovým fragmentom DNA polymerázy I a následne štiepený s NcoI.

Plazmid pRPA-RD-125: optimalizovaný tranzitný peptid (OTP) bol vložený do plazmidu pRPA-RD-124 za vzniku klonovacej kazety obsahujúcej gén EPSPS so signálnym peptidom na lokalizáciu do plastidov. Plazmid pRPA-RD-7 (Európska patentová prihláška EP 652 286) bol naštiepený s enzýmom SphI, opracovaný s T4 DNA polymerázou I a potom naštiepený s enzýmom SpeI. Následne bol purifikovaný OTP fragment. Tento OTP fragment bol naklonovaný do plazmidu pRPA-RD-124, ktorý bol predtým naštiepený s restriktívnym enzýmom NcoI, opracovaný s Klenowovým fragmentom DNA polymerázy I z E. coli a ná-

sledne ešte raz štiepený s enzýmom SpeI. Tento klon bol potom sekvenovaný, aby mohla byť určená správna translačná fúzia medzi OTP a EPSPS. Vzniknutý klon bol nazvaný pRPA-RD-125.

Plazmid pRPA-RD-130: promótor histónu z kukurice H3C4 a sekvencie intrónu 1 adhl z plazmidu pRPA-RD-124 (pozri Patentová prihláška EP 507 698) bol vložený do plazmidu pRPA-RD-125 za vzniku expresnej kazety na použitie v rastlinách na expresiu dvojnásobnej mutantnej formy EPSPS génu v tkanivách jednoklíňnych rastlín. Plazmid pRPA-RD-124 (kazeta obsahujúca promótor histónu z kukurice H3C4 fúzovaný s adhl intrónom 1) bol naštiepený s restriktívnymi enzýmami NcoI a SacI. DNA fragment obsahujúci promótor odvodený z plazmidu pRPA-RD-123 bol následne prečistený a ligovaný s plazmidom pRPA-RD-125, ktorý bol ešte predtým naštiepený s enzýmami NcoI a SacI.

Plazmid pRPA-RD-159: k plazmidu pRPA-RD-125 bol vložený dvojitý promótor H4A748 histónu z *Arabidopsis* (pozri Patentová prihláška EP 507 698) za vzniku kazety na expresiu fúzneho génu „OTP-dvojnásobný mutant génu EPSPS“ v dvojklíňnych rastlinách. Plazmid pRPA-RD-132 (kazeta obsahujúca dvojitý promótor H4A748 histónu z *Arabidopsis*, pozri Patentová prihláška EP 507 698) bola naštiepená s restriktívnymi enzýmami NcoI a SacI. Purifikovaný fragment bol potom naklonovaný do plazmidu pRPA-RD-125, ktorý bol predtým naštiepený s enzýmami EcoRI a SacI.

Plazmid pRPA-RD-173: do plazmidu pRPA-BL-150A (pozri Európska patentová prihláška 508 909) bol vložený gén pre fúzny proteín „H4A748 promótor-OTP-dvojitý mutant EPSPS génu“ z plazmidu pRPA-RD-159 a bol vytvorený transformačný vektor v *Agrobacter tumefaciens*. Plazmid pRPA-RD-159 bol naštiepený s enzýmom NotI a opracovaný s Klenowovým fragmentom DNA polymerázy I z E. coli. Tento fragment bol potom naklonovaný do plazmidu pRPA-BL-150A do restriktívneho miesta SmaI.

ZOZNAM SEKVENCIÍ

INFORMÁCIE O SEKVENCII SEQ ID NO: 1:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:
 - (A) DĹŽKA: 1713 bázových párov
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) POČET VLÁKEN: dve
 - (D) TOPOLOGIA: lineárna
- (ii) TYP MOLEKULY: cDNA
- (vi) PŮVODNÝ ZDROJ:
 - (A) ORGANIZMUS: Zea mays
 - (B) KMEŇ: BMS (Black Mexican Sweet)
- (vii) KONKRÉTNY ZDROJ:
 - (A) KNÍŽNICA: lambda gt10 (pIVB 3-420)
 - (B) KLON: pRPA-ML-711
- (xi) OPIS SEKVENCIE SEQ ID NO: 1

```

ANTCAATTC ACACAGAAA CAGCTATGAC CATGATTAGC AATTCGGGC CCGCCCGTG 60
ATCCGGGCG GACAGGGGCG GCGCGCGTGC AGCGGGGTGC CGAGAGATC GTCTGCGAC 120
CGCTCAGGA GATCTCGGC ACGTCAAGC TCGCGGGTTC CAAGTGGCT TCGAAGCGGA 180
TCTCTACT CTCCGCGCTG TCGAGGGGA CACAGTGGT TGTATAGCTG CTGACAGTG 240
AGGATGTCCA CTACATGCTC GGGGCGTTGA GGACTCTGG TCTCTCTGC GAAGCGGACA 300
AAGTCTGCA ANAGCTGTA GTTGTGGCT GTGGTGGAAA GTTCCAGTT GAGGATGCTA 360
AAGAGAAAT GCAGCTCTC TTGGGAAAT GTGGAACTGC AATCGGCCA TTGACAGCG 420
CTTTACTGC TCTCGTGG AATGCAACTT ACGTCTTGA TGGAGTACA AAGAAAGGG 480

```

ATACAGGATAT TGGGACATGG GGGTGGGAT TGAGGAGGCT TGGGAGGAT GTTGATTTGT 540
 TCGTGGAGAC TGACTGACCA CCGTGGTGGT TCGATGGGAT CCGGAGGCTA CCGTGGTGGCA 590
 NHTTCAGGAT GTCTGGTGGC ATCGAGGCTC ATTACTGGAG TGGCTGGGCTN ATGGCTGGCTC 660
 GTTGGGCTCT TGGGATGGTG GAGATGAAA TCATTGATAA ATTATGCTCC ATTGGTATAG 720
 TGGAAATGAC ATTCAGATGG ATCGAGGCTT TGGGTTGAAA AGCAGAGCAT TCTGATAGCT 780
 GAGACAGATT CTACATTAAG GGAGGTCAAA AATACAGTCC CCGTAAAAAT GCGTATGGTG 840
 AAGGTATGC CTGAGGCA AGCTATTTCT TGGGTGGTGC TGGATATCT GGAGGAGTGC 900
 TGGCTGGGA AGGTTGGGC ACCACAGCTT TGGAGGTGTA TGTGAATTT GGTGAGGTAG 960
 TGGAGATGAT GGGAGGGAAG GTTACATGGA CCGAGACTAG CCGTAACTGTT ACTGGCCAC 1020
 CCGGGAGCC ATTTGGGAGG AAACAGCTTA AGCGGATGTA TGTCAACTG AACAGATGC 1080
 CTGATGGCC CATGACTGTT GCTGTGGTT CCGTCTTTC CGATGGCCG ACAGGATCA 1140
 GAGAGTGGC TTCTGGGA GTAAGGAGA CCGAGAGAT GTTGGGATC CCGAGGAGC 1200
 TAGGAGCT GGGAGACTCT GTTGGAGAG GCGCCGACTA CTGCATGTC AGCGCCGCG 1260
 AGAGCTGAA CCGAGGCG ATCGACAGT ACAGAGCA CAGGATGAC ATGGCTTCT 1320
 CCGTGGCCG CTGTGGGAG GTCCCGGTA CCAATCGGGA CCGTGGGTC ACCGGGAGA 1380
 CCGTGGGTA CTACTGGAT GTGGTAGCA CTTTGGTAAA GAATTAATAA AGGTTGGAT 1440
 ACTACAGCC AGCTGGATG AAGTATGAG CTTGGGCTGA GGAATGAGT TCTTTTGT 1500
 CTGTTTCT CTTCAGCG ATTAGTATT GAGCTGATA CCGTATGTT TTGTAGCAG 1560
 TTTGTATTC GAGTGGAG TTTGTGACT GTAGGAAA TTTGATGTA AGAGTGGTC 1620
 GTTGGATAA TANGATAA ATATGATGTT TCGATGAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1680
 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AACCCGGAA TTC 1713

GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TGC AGT GCC TTG CTG ATG GCT GCT CTT 575
 Gly Ser Ile Ser Ser Ser Glu Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro
 175 180 185
 TGG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC 623
 Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser
 195 200
 ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TGG AGA TGG AGG GAG GGT TTT GGT GTG 671
 Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val
 210 215
 AAA GCA GAG GAT TCT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GCA GGT 719
 Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly
 225 230 235
 GAA AAA TAC AAG TCC GGT AAA AAT GGC TAT GTT GAA GGT GAT GGC TCA 767
 Glu Lys Tyr Lys Ser Ser Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser
 240 245 250
 AGC GCA AGC TAT TTC TGG GCT GGT GGT GCA ATT ACT GGA GGG ACT GTG 813
 Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val
 255 260 265 270
 ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT 863
 Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Glu Gly Asp Val Lys Phe
 275 280 285
 GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GGA GCG AAG GGT ACA TCG ACC GAG ACT 911
 Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr
 290 295 300
 AGC CTA ACT GTT ACT GCC CCA CCG GGG GAG CCA TTT GGG AAG AAA CAC 959
 Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys Cys
 305 310 315
 CTC AAG GCG ATT GAT CTC AAC ATG AAC AAG ATG CCG GAT GTC GGC ATG 1007
 Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met
 320 325 330
 ACT GCT CTT GGG GTT GCC CTT TTT GGC GAT GCG CCG ACA GGC ATC AGA 1055
 Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Phe Thr Ala Ile Arg
 335 340 345 350
 GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGG ATG GTT GCG ATC 1103
 Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile
 355 360 365
 CCG AGC GAG CTA ACC AAG CTG GGA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG GAC 1151
 Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp

INFORMÁCIE O SEKVENCII SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE

- (A) DĹŽKA: 1340 bázových párov
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: dve
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: Zea mays
- (B) KMEŇ: BMS (Black Mexicam Sweet)

(vii) KONKRÉTNÝ ZDROJ:

- (B) KLON: pRPA-ML-716

(ix) CHARAKTERISTICKÉ ČRTY:

- (A) MENO, KLÚČ: CDS
- (B) UMIESTNENIE: 6 až 1337

(xi) OPIS SEKVENCIE SEQ ID NO: 2

CCNTG GGC GGC GAG GAG ATC GTG CTG CAG GCC ATC AAG GAG ATC 47
 Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Glu Pro Ile Lys Glu Ile
 1 10
 TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCC CTT TCC AAC GGG ATC 95
 Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile
 15 20 25 30
 CTC GTA CTC GGC GGC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG 143
 Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Val Val Asp Asn Leu
 35 40 45
 CTS AAG AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GCC TTG AAG ACT CTT 191
 Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu
 50 55 60
 GGT CTT TCT CTC GAA GCG GAC AAA GGT GCC AAA AAT CCT GTA GTT GTT 239
 Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val
 65 70 75
 GGC TGT GGT GGA AAT TTC CCA GTT GAG GAT GCT AAA GAG GAA GTT CAG 287
 Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Glu
 80 85 90
 CTC TTC TTG GGG AAT GCT GGA ACT GCA ATG CCG CCA TTC ACA GCA GCT 335
 Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Thr Ala Met Arg Pro Leu Thr Ala Ala
 95 100 105 110
 GTT ACT GCT GGT GGT GGA AAT GCA ACT TAC GTG CTT GAT GGA GTA CCA 383
 Val Thr Ala Ala Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro
 115 120 125
 AGA ATG AGG GAG AGA CCC ATT GCG GAC TTG GTT CTT GGA TTG AAG CAG 431
 Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Glu
 130 135 140
 CTT GGT GCA GAT GAT TGT TTC CTT GGC ACT GAC TCG CCA GCT GTT 479
 Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Asp Gly Val Pro
 145 150 155
 GGT CTC AAT GGA ATC GGA GGC GTA GCT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT 527
 Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser
 160 165 170

770 775 780
 TCC TCC ATC ATC ACU CCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACC GCG ATC GAC 1198
 Tyr Cys Ile Ile Thr Phe Pro Ser Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp
 785 790 795
 ACC TAC AAC GAC CAC ACC ATG CCG ATG GCG TTC TCC CTT GCC GCG TGT 1247
 Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys
 800 805 810
 GGC GAG GTC CCG CTC ACC ACC CCG GAC CCG GGG TGC ACC GGG AAG ACC 1295
 Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr
 815 820 825 830
 TTC CCG GAC TAC TTC GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT 1337
 Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
 840 845
 TAA 1340

INFORMÁCIE O SEKVENCII SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE

- (A) DĹŽKA: 440 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TOPOLOGIA: lineárna
- (ii) TYP MOLEKULY: proteín

OPIS SEKVENCIE SEQ ID NO: 3

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

<p>Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val 240 245 270</p> <p>Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu 275 280 295</p> <p>Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val 290 295 300</p> <p>Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys 305 310 320</p> <p>Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu 325 330 335</p> <p>Ala Val Val Ala Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val 340 345 350</p> <p>Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr 355 360 365</p> <p>Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys 370 375 380</p> <p>Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr 385 390 395 400</p> <p>Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu 405 410 415</p> <p>Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro 420 425 430</p> <p>Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440</p>	<p>TTG GCT CTT GGG GAT GTG GAG ATT GAA ATC ATT GAT AAA TTA ATC TCC 623 Leu Ala Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser 195 200 205</p> <p>ATT CCG TAC GTC GAA ATG ACA TFS AGA TFS AGZ GAG CDT TTT GGT GTG 671 Ile Pro Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val 210 215 220</p> <p>AAA GCA GAG CAT TGT GAT AGC TGG GAC AGA TTC TAC ATT AAG GSA GGT 719 Lys Ala Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly 225 230 235</p> <p>CAA AAA TAC AAG TCC COT AAR AAT GOC TAT GTT GAA GGT GAT GCC TCA 767 Gln Lys Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser 240 245 250</p> <p>AGC GCA AGC TAT TTC TTG GCT GGT GCT GCA ATT ACT GSA GGG ACT GTG 815 Ser Ala Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val 255 260 270</p> <p>ACT GTG GAA GGT TGT GGC ACC ACC AGT TTG CAG GGT GAT GTG AAG TTT 863 Thr Val Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe 275 280 285</p> <p>GCT GAG GTA CTG GAG ATG ATG GSA GCG AAG GTT ACA TGG ACC GAG ACT 911 Ala Glu Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr 290 295 300</p> <p>AGC GTA ACT GTT ACT GGC CCA CCG GGG GAG CCA TTT GGG AGG AAA CAC 959 Ser Val Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His 305 310 315</p> <p>CTC AAG GGG ATT GAT GTC AAC ATG AAC AAG ATG COT GAT GTC GOC ATG 1007 Leu Lys Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met 320 325 330</p> <p>ACT CTT GCT GTG GTT GGC CTC TTT GGC GAT GGC CCG ACA GGC ATC AGA 1055 Thr Leu Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg 335 340 345 350</p> <p>GAC GTG GCT TCC TGG AGA GTA AAG GAG ACC GAG AGS ATG GTT GGS ATC 1103 Asp Val Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile 355 360 365</p> <p>GGG AGG GAG GTA ACC AAG CTG GSA GCA TCT GTT GAG GAA GGG CCG SAC 1151 Arg Thr Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp 370 375 380</p> <p>TAC TGC ATC ATC ACC GCG CCG GAG AAG CTG AAC GTG ACA GCG ATC GAC 1199 Tyr Cys Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp 385 390 395</p> <p>ACT TAC GAC GAC CAC AAG ATG GGS ATG GCC TTC TCC CTT GGC GGC TGT 1241 Thr Tyr Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys 405 410 415</p> <p>GCC GAG GTC CCG GTG ACC ATC CCG GAC CCT GGG TCC ACC GSS AAG ACC 1295 Ala Glu Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr 420 425 430</p> <p>TTG CCG GAG TAC TTG GAT GTG CTG AGC ACT TTC GTC AAG AAT 1337 Phe Pro Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn 435 440</p> <p>TAA 1340</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

INFORMÁCIE O SEKVENCII SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 1340 bázových párov
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: dve
- (D) TOPOLOGIA: lineárna

(vi) PÔVODNÝ ZDROJ:

- (A) ORGANIZMUS: Zca mays
- (B) KMEN: BMS (Black Mexicam Sweet)

(vii) KONKRÉTNÝ ZDROJ:

- B) KLON: pRPA-ML-720

(xi) OPIS SEKVENCIE SEQ ID NO: 4

<p>CCATG GGC GGC GAG GAG ATC GTG CTG CAG CCC ATC AAG GAG ATC 47 Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile 1 5 10</p> <p>TCC GGC ACC GTC AAG CTG CCG GGG TCC AAG TCG CTT TCC AAC CCG ATC 95 Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile 15 20 25 30</p> <p>CTC GTA CTC GGC GGC CTG TCC GAG GGG ACA ACA GTG GTT GAT AAC CTG 143 Leu Leu Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu 35 40 45</p> <p>CTG AAC AGT GAG GAT GTC CAC TAC ATG CTC GGG GOC TTG AGG ACT CTT 191 Leu Asn Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu 50 55 60</p> <p>GCT CTC TCT GTC GAA GCG GAC AAA GCT AAA AGA GCT GTA GTT GTT 239 Gly Leu Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val 65 70 75</p> <p>GAC TGT CTT GSA AAG TTC GCA CTT GAG GAT GCT AAA GAT GAA ATG CAG 287 Gly Cys Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln 80 85 90</p> <p>CTC TTC TTT GAG AAT GCT GSA ATC GCA ATG CAG TCC TTG ACA GCA GCT 335 Leu Phe Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala 95 100 105 110</p> <p>GTT ACT GCT GGT GGT GGA AAT GCA ACT TAC TTG CTT GAT GSA GTA CCA 383 Val Thr Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro 115 120 125</p> <p>AGA ATG AAG GAG AGA CCG ATT GGC GAC TTG GTT GTC GGA TTG AAG CAG 431 Arg Met Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln 130 135 140</p> <p>CTT GGT GCA GAT GTT GAT TGT TTT CTT GGC ACT GAC TGC CCA COT GCT 479 Leu Gly Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val 145 150 155</p> <p>GCT GTC AAT GSA ATC GSA GGG GTA CTT GGT GGC AAG GTC AAG CTG TCT 527 Arg Val Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser 160 165 170</p> <p>GGC TCC ATC AGC AGT CAG TAC TTG AGT GGC TTG CTG ATG GCT GCT CCT 575 Gly Ser Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro 175 180 185 190</p>	<p>Ala Gly Ala Glu Glu Ile Val Leu Gln Pro Ile Lys Glu Ile Ser Gly 15 1 5 10 15</p> <p>Thr Val Lys Leu Pro Gly Ser Lys Ser Leu Ser Asn Arg Ile Leu Leu 30 20 25 30</p> <p>Leu Ala Ala Leu Ser Glu Gly Thr Thr Val Val Asp Asn Leu Leu Asn 45 35 40 45</p> <p>Ser Glu Asp Val His Tyr Met Leu Gly Ala Leu Arg Thr Leu Gly Leu 60 50 55 60</p> <p>Ser Val Glu Ala Asp Lys Ala Ala Lys Arg Ala Val Val Val Gly Cys 80 65 70 75 80</p> <p>Gly Gly Lys Phe Pro Val Glu Asp Ala Lys Glu Glu Val Gln Leu Phe 95 85 90 95</p> <p>Leu Gly Asn Ala Gly Ile Ala Met Arg Ser Leu Thr Ala Ala Val Thr 110 100 105 110</p> <p>Ala Ala Gly Gly Asn Ala Thr Tyr Val Leu Asp Gly Val Pro Arg Met 125 115 120 125</p> <p>Arg Glu Arg Pro Ile Gly Asp Leu Val Val Gly Leu Lys Gln Leu Gly 140 130 135 140</p> <p>Ala Asp Val Asp Cys Phe Leu Gly Thr Asp Cys Pro Pro Val Arg Val 160 145 150 155 160</p> <p>Asn Gly Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Lys Val Lys Leu Ser Gly Ser 175 165 170 175</p> <p>Ile Ser Ser Gln Tyr Leu Ser Ala Leu Leu Met Ala Ala Pro Leu Ala 190 180 185 190</p> <p>Leu Gly Asp Val Glu Ile Glu Ile Ile Asp Lys Leu Ile Ser Ile Pro 205 195 200 205</p> <p>Tyr Val Glu Met Thr Leu Arg Leu Met Glu Arg Phe Gly Val Lys Ala 220 210 215 220</p> <p>Glu His Ser Asp Ser Trp Asp Arg Phe Tyr Ile Lys Gly Gly Gln Lys 240 225 230 235 240</p> <p>Tyr Lys Ser Pro Lys Asn Ala Tyr Val Glu Gly Asp Ala Ser Ser Ala 255 245 250 255</p> <p>Ser Tyr Phe Leu Ala Gly Ala Ala Ile Thr Gly Gly Thr Val Thr Val 270 260 265 270</p> <p>Glu Gly Cys Gly Thr Thr Ser Leu Gln Gly Asp Val Lys Phe Ala Glu 285 275 280 285</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

INFORMÁCIE O SEKVENCII SEQ ID NO: 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCIE:

- (A) DĹŽKA: 444 aminokyselín
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) TOPOLOGIA: lineárna
- (ii) TYP MOLEKULY: proteín

OPIS SEKVENCIE SEQ ID NO: 5

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

Val Leu Glu Met Met Gly Ala Lys Val Thr Trp Thr Glu Thr Ser Val
290 295 300

Thr Val Thr Gly Pro Pro Arg Glu Pro Phe Gly Arg Lys His Leu Lys
305 310 315 320

Ala Ile Asp Val Asn Met Asn Lys Met Pro Asp Val Ala Met Thr Leu
325 330 335

Ala Val Val Ala Leu Phe Ala Asp Gly Pro Thr Ala Ile Arg Asp Val
340 345 350

Ala Ser Trp Arg Val Lys Glu Thr Glu Arg Met Val Ala Ile Arg Thr
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ser Val Glu Glu Gly Pro Asp Tyr Cys
370 375 380

Ile Ile Thr Pro Pro Glu Lys Leu Asn Val Thr Ala Ile Asp Thr Tyr
385 390 395 400

Asp Asp His Arg Met Ala Met Ala Phe Ser Leu Ala Ala Cys Ala Glu
405 410 415

Val Pro Val Thr Ile Arg Asp Pro Gly Cys Thr Arg Lys Thr Phe Pro
420 425 430

Asp Tyr Phe Asp Val Leu Ser Thr Phe Val Lys Asn
435 440

13. Spôsob produkcie rastlín so zvýšenou toleranciou k herbicídum pôsobiacich proti EPSPS syntáze ako svojmu cieľu, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, rastlinné bunky alebo protoplasty sa transformujú sekvenciou DNA podľa jedného z nárokov 1 až 4 a následne sa transformované bunky podrobia regenerácii.

14. Spôsob ošetrenia rastlín herbicídum pôsobiacim proti EPSPS syntáze ako svojmu cieľu, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že herbicíd sa aplikuje na rastliny podľa nároku 12.

15. Spôsob podľa nároku 14, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa aplikuje glyfosat alebo jeho prekurzor.

Koniec dokumentu

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sekvencia rastlinnej DNA kódujúca mutovanú 5-enolpyruvylsukcínát-3-fosfátsyntázu (EPSPS), **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje aspoň jednu substitúciu treonínu za izoleucín, pričom treonín zodpovedá pozícii 102 v sekvencii EPSPS z kukurice, a jednu substitúciu prolínu za serín, pričom prolín zodpovedá pozícii 106 v sekvencii EPSPS z kukurice.

2. Sekvencia rastlinnej DNA podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje navyše ešte mutáciu spočívajúcu v substitúcii glycínu 101 za alanín.

3. Sekvencia rastlinnej DNA podľa nároku 1 alebo 2, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že pochádza z kukurice.

4. Sekvencia rastlinnej DNA podľa nároku 3, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že je vyjadrená sekvenciou SEQ ID NO: 4.

5. Mutovaný rastlinný proteín EPSPS, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje aspoň jednu substitúciu treonínu za izoleucín, pričom treonín zodpovedá pozícii 102 v sekvencii EPSPS z kukurice, a jednu substitúciu prolínu za serín, pričom prolín zodpovedá pozícii 106 v sekvencii EPSPS z kukurice.

6. Mutovaný rastlinný proteín EPSPS podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že je vyjadrený sekvenciou SEQ ID NO: 5.

7. Chimérický gén obsahujúci kódujúcu sekvenciu a regulačné elementy v polohe 5' a 3', ktoré sú heterológne a sú schopné fungovať v rastlinách, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ako kódujúcu sekvenciu obsahuje aspoň jednu sekvenciu DNA podľa jedného z nárokov 1 až 4.

8. Chimérický gén podľa nároku 7, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje promótor z rastlinného vírusu.

9. Chimérický gén podľa nároku 7, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje rastlinný promótor, napríklad promótor a-tubulínu, histónu, intrónov, aktínu a tak ďalej.

10. Vektor na transformáciu rastlín, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje aspoň jeden chimérický gén podľa jedného z nárokov 8 až 9.

11. Rastlinná bunka, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje aspoň jeden chimérický gén podľa jedného z nárokov 8 až 9.

12. Rastlina, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že je získaná regeneráciou z rastlinnej bunky podľa nároku 11.