



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: C 12 N 15/31 A 01 H 1/00 C 12 N 1/20 C 12 N 5/14

(21) Patentansøgning nr: PA 1988 00239

(22) Indleveringsdag: 1988-01-20

(24) Løbedag: 1988-01-20

(41) Alm. tilgængelig: 1988-07-22

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2005-02-28

(30) Prioritet: 1987-01-21 DE 3701624 1987-11-07 DE 3737918

(73) Patenthaver: Hoechst Aktiengesellschaft, Brüningstrasse 45, D-65926 Frankfurt/Main, Tyskland

(72) Opfinder: Eckhard Strauch, Rosenheide 2, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Walter Arnold, Am Gottesberg 25, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Renate Alijah, Koesterkamp 14, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Wolfgang Wohleben, Menzelstrasse 1, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Alfred Puehler, Am Waldschlosschen 2, D-4800 Bielefeld, Tyskland
Peter Eckes, Am Flachsland 18, D-6233 Kelkheim (Taunus), Tyskland
Guenter Donn, Sachsenring 35, D-6238 Hofheim am Taunus, Tyskland
Eugen Uhlmann, Zum Talblick 31, D-6246 Glashuetten/Taunus, Tyskland
Friedrich Hein, Erlesring 40, D-6234 Hattersheim am Main, Tyskland
Friedrich Wengenmayer, Am Seyenbach 38, D-6238 Hofheim am Taunus, Tyskland

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark

(54) Benævnelse: Resistensgen, genstruktur indeholdende resistensgenet, vektor indeholdende resistensgenet eller genstrukturen, værtscelle indeholdende vektoren, plantecelle, planter, dele heraf og frø indeholdende resistensgen, samt anvendelse af resistensgenet eller genstrukturen

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

Det lød fra genomet af *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736 isolerede phosphinothricin (PTC)-resistensgen syntetiseres efter tilpasning til codonbrugen i planter, og det indbygges i genstrukturer, der efter ekspression i planter gør disse resistente mod PTC.

Den foreliggende opfindelse angår et phosphinothricin-resistens-gen, en genstruktur indeholdende resistensgenet, en vektor indeholdende resistensgenet eller genstrukturen, en værtscelle indeholdende vektoren, en plantecelle, planter, dele heraf og frø indeholdende resistensgenet, samt anvendelsen af resistensgenet eller genstrukturen til tilvejebringelse af phosphinothricin-resistente planteceller, plantedele, planter og frø.

I den vesttyske patentansøgning nr. P 3.628.747.4 foreslås et resistensgen mod phosphinothricin (PTC), der kan fås ud fra hele DNA'et fra for phosphinothricyl-alanyl-alanin (PTT)-resistens selekteret *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736 (fra den almindelige samling) eller DSM 4112 (deponeret i henhold til Budapest-traktaten) ved snit med BamHI, kloning af et 4,0 kb-stort fragment og selektion for PTT-resistensen, samt anvendelsen af dette gen til fremstilling af PTC-resistente planter, som PTT-resistens-markør i bakterier og som PTC-resistens-markør i planteceller. Det 4 kb-store BamHI-fragment, i hvilket resistensgenet ligger, er nærmere defineret ved hjælp af et restriktionskort (figur 1).

Ved kloning af delområder af dette 4 kb-fragment blev beliggenheden af kodeområdet nærmere lokaliseret. Herved viste det sig, at resistensgenet ligger i 1,6 kb SstII-SstI-fragmentet (positionerne 0,55 til 2,15 i figur 1 i hovedansøgningen). Ved fordøjelse med BglII udvindes et 0,8 kb-stort fragment, der efter indbygning i et plasmid og transformation af *S. lividans* formidler PTT-resistens. Denne resistens er betinget af N-acetylering af PTC. Resistensgenet koder dermed for en acetyltransferase.

I den vesttyske patentansøgning nr. P 3.642.829.9 gengives DNA-sekvensen af det i det forestående nævnte 0,8 kb-fragment. Ud fra sekvensen kan startcodonnet og gensekvensens åbne læseramme bestemmes. Det sidste nucleotid er en del af stop-codonnet TGA.

Gener fra Streptomyceter har med et forhold mellem adenin (A) + thymin (T) : guanin (G) + cytosin (C) på ca. 30% : 70% en meget stor andel af G + C. GC-Andelen af plantegener ligger med ca. 50% langt lavere. Af disse 5 grunde bliver resistensgenets DNA-sekvens optimeret i yderligere udformning af opfindelsens ide ved nysyntese af et for den vegetabiliske RNA-polymerase II gunstigt codonbrug.

Opfindelsen angår en modifikation af det resistens- 10 gen, der er foreslået i de tyske patentansøgninger nr. P 3.628.747.4 og P 3.642.829.9, nemlig en tilpasning til codonbrugen i planter

Opfindelsen angår nærmere bestemt følgende:

- et resistensgen, der koder for proteinet med aminosyresekvensen I (anført nedenfor), idet der som start-codon anvendes ATG og som stopcodon TGA, og genets GC-andel er tilpasset GC-andelen i planter, 15
- en genstruktur, som er kendetegnet ved, at DNA-sekvensen I er koblet til i planter aktive regulations- og 20 ekspressionssignaler,
- en vektor, som er kendetegnet ved resistensgenet ifølge opfindelsen,
- en vektor, som er kendetegnet ved en genstruktur ifølge opfindelsen,
- 25 - vektorer indeholdende én eller flere DNA-sekvenser valgt blandt:

I (nucleotid nr. 1-152)

II (nucleotid nr. 153-312)

30 III (nucleotid nr. 313-436) eller

IV (nucleotid nr. 437-558),

- en værtscelle, som er kendetegnet ved en vektor ifølge opfindelsen,
- 35 - en plantecelle eller planter, dele heraf og frø, som er kendetegnet ved et gen ifølge

opfindelsen, og
- anvendelsen af genet eller genstrukturen ifølge
opfindelsen til tilvejebringelse af phosphino-
thricin-resistente planteceller, plantedele,
5 planter og frø.

Den genetiske kode er som bekendt således beskaffen,
at en enkelt triplet koder kun for 2 aminosyrer, medens hver
af de resterende 18 aminosyrer, som der kan kodes for
10 genetisk, er tilordnet 2-6 tripletter. Til syntesen af
genet er der derfor teoretisk mulighed for en stor mang-
foldighed af codonkombinationer. Da den nævnte relative
andel af de enkelte nukleotider i hele DNA-sekvensen
er af indflydelse, er dette lagt til grund for et af kri-
15 terierne ved sekvensoptimeringen.

Følgende ændringer er gennemført i det sekvenserede
gen:

1. Streptomycetgen-startcodonnet GTG (position 258-260
i sekvensen fra den vesttyske patentansøgning) udskif-
20 tes med det af vegetabilsk RNA-polymerase II benyttede
startcodon ATG.
2. Inden for genet forandres Streptomycet-gencodonerne
således, at det resulterer i i plantegener egnede codon-
ner (G/C-forhold).
- 25 3. Til afslutning af translationsforløbet sættes TGA-
stopcodonnet på sekvensens afslutning.
4. Gensekvensens begyndelse og afslutning forsynes med
overhængende afslutninger af restriktionssteder for
at kunne amplificere genet, og for at kunne ligere
30 genet mellem vegetabiliske regulationssekvenser.
5. Palindromiske sekvenser reduceres til et mindstemål.

DNA-Sekvensen I ifølge opfindelsen (med den til-
svarende aminosyresekvens) er anført nedenfor.

Tre interne singulære skæringssteder for restri-
35 ktionsenzymene XbaI (position 152), BamHI (312) og XmaI
(436) gør det muligt med subkloning af delsekvenser, der
kan være indbygget i velundersøgte kloningsvektorer, så-
som pUC18 eller PUC19. Endvidere er der inden for genet

indbygget en række yderligere singulære genkendelsessteder for restriktionsenzymmer, der på den ene side skaffer adgang til acetyltransferases delsekvenser og på den anden side tillader gennemførelse af variationer:

5	<u>Restriktionsenzym</u>	<u>Snit efter nucleotid-nr. (kodende streng)</u>
	BspMII	11
	SacII	64
10	EcoRV	74
	HpaI	80
	AatII	99
	BstXI	139
	ApaI	232
15	ScaI	272
	AvrII	308
	AflIII	336
	StuI	385
	BssHIII	449
20	FokI	487
	BglI	536
	BglII	550

Opbygningen af delsekvenserne ved hjælp af kemisk syntese og enzymatisk ligeringsreaktion udføres på i og for sig kendt måde (de europæiske patentansøgninger nr. 0.133.282, 0.136.472, 0.155.590, 0.161.504, 0.163.249, 0.171.024, 0.173.149 eller 0.177.827). Detaljer, såsom restriktionsanalyser, ligering af DNA-fragmenter og transformation af plasmider i *E. coli*, er udførligt beskrevet i Maniatis' lærebog (Molecular Cloning, Maniatis et al., Cold Spring Harbor, 1982).

Den således klonede gensekvens, indføres herefter under kontrol af vegetabiliske regulationssignaler i planter, og den bringes til ekspression. Den europæiske patentansøgning nr. 0.122.791 giver en oversigt over kendte metoder. Der fås således PTC-resistente planteceller (dvs.

man har et selektionskendetegn for transformerede celler), planter eller plantedele og frø.

I de følgende eksempler illustreres i enkeltheder nogle udformninger af opfindelsen. Procentangivelser er baseret på vægten, når andet ikke er anført.

Eksempler

De følgende medier anvendes:

a) til bakterier:

- 10 YT-medium: 0,5% gærekstrakt, 0,8% bacto-trypton, 0,5% NaCl,
LB-medium: 0,5% gærekstrakt, 1% bacto-trypton, 1% NaCl
som fast medium: hver gang tilsætning af 1,5% agar,

b) til planter:

- 15 M+S-medium: se Murashige og Skoog, Physiologica Plantarum 15 (1962) 473,
2MS-medium: M+S-medium med 2% saccharose,
MSC10-medium: M+S-medium med 2% saccharose, 500 mg/l cefotaxim, 0,1 mg/l naphthyleddikesyre (NAA), 1 mg/l benzylaminopurin (BAP),
20 100 mg/l kanamycin,
MSC15-medium: M+S-medium med 2% saccharose, 500 mg/l cefotaxim, 100 mg/l kanamycin.

25 1. Kemisk syntese af et enkeltstrenget oligonucleotid.

Som udgangsmateriale til syntesen af fragmentet II, der er et af de fire delfragmenter I - IV, tjener det endestillede oligonucleotid IIc (nucleotiderne nr. 219 til 312 i DNA-sekvensen I's kodende streng). Til fast-fasesyntesen anvendes nucleosidet i 3'-enden, i det foreliggende tilfælde altså guanosin (nucleotid nr. 312), via 3'-hydroxyfunktionen kovalent bundet til et bærestof. Bærestofmaterialet er med langkædede aminoalkylgrupper funktionaliseret CPG ("Controlled Pore Glass"). I øvrigt følger syntesen de kendte metoder (fra de på side 3, linje 35 27-28, nævnte europæiske patentansøgninger).

Synteseplanen er indtegnet i DNA-sekvensen II, der

i øvrigt svarer til DNA-sekvensen I.

2. Enzymatisk binding af de enkeltstrengede oligonucleotider til genfragmentet II.

Til phosphorylering af oligonucleotiderne i 5'-terminalen behandles hvert 1 nmol af oligonucleotiderne I Ib og I Ic med 5 nmol adenosintriphosphat og 4 enheder T4-polynucleotid-kinase i 20 μ l 50 mM tris-HCl-puffer (pH-værdi 7,6), 10 mM magnesiumchlorid og 10 mM dithiothreitol (DTT) i 30 minutter ved 37°C. Enzymet inaktiveres ved fem minutters opvarmning til 95°C. Oligonucleotiderne I Ia og I Id, der danner den "overhængende" sekvens i DNA-fragmentet II, phosphoryleres ikke. Dette forhindrer ved den efterfølgende ligering dannelse af større subfragmenter end de, der svarer til DNA-fragmentet II.

Oligonucleotiderne II (a-d) liggeres som følger til subfragmentet II: hvert 1 nmol af oligonucleotiderne I Ia og I Id samt 5'-phosphaterne af I Ib og I Ic opløses sammen i 45 μ l puffer, der indeholder 50 mM tris-HCl (pH-værdi 7,6), 20 mM magnesiumchlorid, 25 mM kaliumchlorid og 10 mM DTT. Til annealing af oligonucleotiderne ifølge DNA-fragmentet II opvarmes opløsningen af oligonucleotiderne i 2 minutter til 95°C, hvorefter der langsomt (2-3 timer) afkøles til 20°C. Til enzymatisk binding sættes herefter 2 μ l 0,1 M DTT, 8 μ l 2,5 mM adenosintriphosphat (pH-værdi 7) samt 5 μ l T4-DNA-ligase (2000 units) til blandingen, og der inkuberes i 16 timer ved 22°C.

Oprensningen af genfragmentet II sker ved gelelektroforese på en 10% polyacrylamidgel (uden tilsætning af urinstof, 20·40 cm, 1 mm tyk), hvorved der som mærknings-substans anvendes ϕ X 174 DNA (Fa. BRL), der er skåret med HinfI, eller pBR322, der er snittet med HaeIII.

Fremstillingen af genfragmenterne I, III og IV sker analogt hermed, idet dog de "overhængende" sekvenser omdannes til 5'-phosphaterne før annealingen, da det ikke er nødvendigt med noget ligeringstrin.

3. Fremstilling af hybridplasmider, der indeholder genfragmenterne I, II, III og IV.

a) Indbygning af genfragmentet I i pUC18.

Det handelsgængse plasmid pUC18 åbnes på kendt måde med restriktionsendonucleaserne SalI og XbaI som beskrevet af fremstilleren. Fordøjelsesblandingen adskilles på kendt måde på en 1% agarosegel ved elektroforese, og brudstykkerne gøres synlige ved farvning med ethidiumbromid. Plasmidbåndene (ca. 2,6 kb) udskæres derefter fra agarosegelen og adskilles fra agarosen ved elektroelution.

1 µg Plasmid, der er åbnet med XbaI og SalI, liggeres herefter med 10 ng af DNA-fragmentet I natten over ved 16°C.

b) Indbygning af genfragmentet II i pUC18.

Analogt med a) opskæres pUC18 med XbaI og BamHI, og det liggeres med genfragmentet II, der forud er phosphoryleret i den overhængende ende som beskrevet i eksempel 2.

c) Indbygning af genfragmentet III i pUC18.

Analogt med a) opskæres pUC18 med BamHI og XmaIII, og det liggeres med genfragmentet III.

d) Indbygning af genfragmentet IV i pUC18.

Analogt med a) skæres pUC18 med XmaIII og SalI, og der liggeres med genfragmentet IV.

4. Opbygning af det komplette gen og kloning i et pUC-plasmid.

a) Transformation og amplifikation af genfragmenterne I - IV.

De således opnåede hybridplasmider transformeres i E. coli. Hertil gøres stammen E. coli K 12 kompetent ved behandling med en 70 mM calciumchloridopløsning, og hertil sættes suspensionen af hybridplasmidet i 10 mM tris-HCl-puffer (pH-værdi 7,5), der er 70 mM med hensyn til calciumchlorid. De transformerede stammer selekteres på gængs måde under anvendelse af den plasmid-overførte antibiotikaresistens eller -følsomhed, og hybridvektorerne amplificeres. Efter at have dræbt cellerne isoleres hybridplasmiderne, og de opskæres med de oprindeligt anvendte

restriktionsenzymmer, hvorefter genfragmenterne I, II, III og IV isoleres ved genelektroforese.

b) Binding af genfragmenterne I, II, III og IV til et helt gen.

5 De ved amplifikation opnåede subfragmenter I og II forbindes som følger. Hver 100 ng af de isolerede fragmenter I og II opløses sammen i 10 µl puffer, der indeholder 50 mM tris-HCl (pH 7,6), 20 mM magnesiumchlorid og 10 mM DTT, og denne opløsning opvarmes i 5 minutter til 57°C. 10 Herefter afkøles opløsningen til stuetemperatur, hvorefter man til blandingen sætter 1 µl 10 mM adenosintri-phosphat (pH 7) samt 1 µl T4-DNA-ligase (400 enheder), og der inkuberes i 16 timer ved stuetemperatur. Efter at have efterklippet med restriktionsenzymene SallI og BamHI oprenses 15 det ønskede 312-bp-fragment (nucleotiderne 1-312, SallI-BamHI) ved gelelektroforese på en 8% polyacrylamidgel, hvorved der som mærkningssubstans anvendes ØX 174 RF DNA (Fa. BRL), der er skåret med restriktionsenzymet HaeIII.

På samme måde forbindes genfragmenterne III og IV 20 med hinanden, hvorved man efter oprensning får et 246-bp-fragment (nucleotiderne 313-558, BamHI-SallI). Som markør ved gelelektroforese anvendes pBR322, der er skåret med restriktionsenzymet MspI.

Til opbygning af hele genet. (DNA-sekvens I) ligeres 25 15 ng af 312-bp-fragmentet og 12 ng af 246 bp-fragmentet som ovenfor beskrevet med 1 µg af det handelsgængse plasmid pUC18, der forud er udskåret med restriktionsenzymet SallI, og som er dephosphoryleret i enderne. Efter transformationen og amplifikationen (som beskrevet i eksempel 30 4a) identificeres ved SallI-fordøjelse den rigtige klon med 558 bp-fragmentet ifølge DNA-sekvensen I.

5. Transformation af hybridplasmiderne.

Kompetente E. coli-celler transformeres med 0,1-1 35 µg af hybridplasmidet, der indeholder DNA-sekvensen I, og cellerne udspreddes på agarplader, der indeholder ampicillin. Dernæst kan kloner, der indeholder de korrekt integrerede sekvenser i plasmidet, identificeres ved

DNA-hurtigoparbejdning (Maniatis i førmtalte bog).

6. Fusion af det syntetiserede gen: til regulationssignaler, der genkendes i planter.

5 Det med SalI-snitsteder i enderne forsynede optimerede resistensgen ligeres til polylinkersekvensens SalI-snitsted i plasmidet pDH51 (Pietrzak et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 5857). På dette plasmid er igangsætter og afslutter af 35S-transkriptet fra Cauliflower Mosaic Virus lokaliseret, der kan genkendes af det
10 vegetabiliske transkriptionsapparat.

Ved ligering af resistensgenet indføres dette bagved igangsætter og foran afslutter af 35S-transkriptet. Den korrekte orientering af genet bekræftes ved restriktionsanalyser.

15 Igangsætter af ST-LS1-genet fra *Solanum tuberosum* (Eckes et al., Mol. Gen. Genet. 205 (1986) 14) anvendes ligeledes til ekspresion af det optimerede acetyltransferase-gen i planter.

7. Indsætning af resistensgenet med regulationssekvenserne i *Agrobacterium tumefaciens*.
20 a) Kointegrat-metode.

Den samlede transkriptionsenhed for igangsætter, optimeret resistensgen og afslutter (eksempel 6) udskæres med restriktionsenzymet EcoRI, og den ligeres i den inter-
25 mediære *E. coli*-vektor pMPK110's EcoRI-snitsted (Peter Eckes, Dissertation, Univ. Köln, 1985, s. 91 f.). Denne intermediære vektor er nødvendig for at overføre resistensgenet med dets regulationsskvenser til Ti-plasmidet fra *Agrobacterium tumefaciens*. Denne såkaldte konjugation
30 gennemføres ifølge den af Van Haute et al. (EMBO J. 2 (1983) 411) beskrevne fremgangsmåde. Herved integreres genet med dets regulationssignaler ved homolog rekombination via de i pMPK110-vektoren og i Ti-plasmidet pGV3850kanR (Jones et al., EMBO J. 4 (1985) 2411) indeholdte sekvenser
35 af standardvektoren pBR322 i Ti-plasmidet.

Hertil sammenblandes hver 50 µl friske bouillonkulturer af *E. coli*-stammerne DH1 (pMPK110-derivatets

værtsstamme) og GJ23 (Van Haute et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 5857) på en tør YT-agarplade, og der inkuberes i 1 time ved 37°C. Bakterierne suspenderes igen i 3 ml 10 mM MgSO₄, og de udsprede på antibiotika-agarplader

5 (spectinomycin 50 µg/ml: selektion for pMPK110, tetracyclin 10 µg/ml: selektion for R64drd11, kanamycin µg/ml: selektion for pGJ28). De bakterier, der vokser på de selektive agarplader, indeholder de tre plasmider, og de opformer

10 til konjugationen med *Agrobacterium tumefaciens* i YT-bouillonmedium ved 37°C. Agrobakterierne dyrkes i LB-medium ved 28°C. Hver 50 µl bakteriesuspension sammenblandes på en tør YT-agarplade, og der inkuberes i 12-16 timer ved 28°C. Bakterierne suspenderes igen i 3 ml 10 mM MgSO₄, og der udsprede på antibiotikaplader (erythromycin 0,05 g/l, chloramphenicol 0,025 g/l: selektion for

15 agrobakteriestammen; streptomycin 0,3 g/l og spectinomycin 0,1 g/l: selektion for integrationen af pMPK110 i Ti-plasmidet). På disse selektive plader kan der nu kun vokse agrobakterier, ved hvilke pMPK110-derivatet ved en homo-

20 log rekombination er integreret i det bakterielle Ti-plasmid.

Foruden det allerede forud eksisterende i planter aktive resistensgen mod antibiotikumet kanamycin er også resistensgenet mod PTC nu lokaliseret på Ti-plasmidet

25 pGV3850kanR. Før disse agrobakteriekloner anvendes til transformationen, undersøges det ved hjælp af en "Southern-Blot"-undersøgelse, om den ønskede integration er sket.

b) Binær vektor-metode.

Der anvendes det binære vektorsystem, der er beskrevet

30 af Koncz et al. i Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383. Den af Koncz et al. (PNAS 84 (1987) 131) beskrevne vektor pPCV701 forandres på følgende måde: ved hjælp af restriktionsenzymene BamHI og HindIII fjernes et fragment, på hvilket igangsætterne TR1 og TR2 bl.a. er lokaliseret, fra vektoren.

35 Det fremkomne plasmid ringsluttet igen. I det tilstedeværende EcoRI-snitsted på denne vektor indføres et ca. 800 basepar langt fragment fra vektoren pDH51, på hvilket igang-

sætter og afslutter af 35S-transkriptet fra Cauliflower Mosaic Virus ligger (Pietrzak et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 5858). Det resulterende plasmid pPCV801 har et singulært Sali-snitsted mellem 35S-igangsætteren og -afslutteren. I dette snitsted indføjes det 5 optimerede PTC-resistensgen. Ekspressionen heraf står nu under 35S-transkript-regulationssekvensernes kontrol.

Dette plasmid (pPCV801Ac) transformeres i E. coli-stammen SM10 (Simon et al., Bio/Technology 1 (1983), 10 784). Til overførsel af plasmidet pPCV801Ac til Agrobacterium tumefaciens sammenblandes hver 50 µl af SM10-kulturen og en C58-agrobakteriekultur (GV3101, Van Larebeke et al., Nature 252 (1974) 169) med Ti-plasmidet pMP90RK (Koncz et al., Mol. Gen. Genet. 204 (1986) 383) 15 som hjælpeplasmid på en tør YT-agarplade, og der inkuberes i ca. 16 timer ved 28°C. Bakterierne resuspenderes derefter i 3 ml 1 mM MgSO₄, og der udsprede på antibiotika-plader (rifampicin 0,1 g/l: selektion for GV3101, kanamycin 0,025 g/l: selektion for pMP90RK, carbenicillin 20 0,1 g/l: selektion for pPCV801Ac). På disse plader kan kun vokse agrobakterier, der indeholder begge plasmider (pMP90RK og pPCV801Ac). Før disse agrobakterier anvendes til plantetransformationen, blev det ved hjælp af "Southern Blotting" undersøgt, om plasmidet pPCV801Ac er til stede 25 i dets korrekte form i agrobakterierne.

8. Transformation af *Nicotiana tabacum* via *Agrobacterium tumefaciens*.

Det optimerede resistensgen overføres ved hjælp af den såkaldte "leaf disc"-transformationsmetode til tobaksplanter. 30

Agrobakterierne fremdyrkes i 30 ml LB-medium med de tilsvarende antibiotika ved 28°C under stadig omrystning (ca. 5 dage). Herefter sedimenteres bakterierne ved en 10 minutters centrifugering ved 7000 opm i en Christ-centrifuge, og der vaskes én gang med 20 ml 10 mM MgSO₄. 35 Efter yderligere en centrifugering suspenderes bakterierne i 20 ml 10 mM MgSO₄, og de overføres til en petriskål. Til

bladskive-infektionen anvendes blade af i sterilkultur på 2MS-medium voksende Wisconsin 38-tobaksplanter. Alle sterilkulturer holdes ved 25-27°C i en rytme med 16 timers hvidt lys/8 timers mørke.

5 Blade fra tobaksplanten snittes af, og bladoverfladen såres med sandpapir. Efter at have såret bladene snittes de i mindre stykker, og de dyppes i bakteriekulturen. Herefter overføres bladstykkerne til M+S-medium, og de holdes i 2 dage under normale kulturbetingelser. Efter to dages
10 infektion med bakterierne vaskes bladstykkerne i et flydende M+S-medium, og de overføres til MSC10-agarplader. Transformerede spirer selekteres på baggrund af den medoverførte resistens mod antibiotikumet kanamycin. 3-6 Uger senere bliver den første spire synlig. Enkelte spirer videredyrkes på MSC15-medium i glasbeholdere. I de følgende uger danner
15 nogle af de afskårne spirer rod på snitstedet.

Transformerede planter kan også selekteres direkte på PTC-holdige plantemedier. Ved DNA-analyse ("Southern Blotting") og RNA-analyse ("Northern Blotting") af de
20 transformerede planter påvises tilstedeværelsen og expressionen af PTC-resistensgenet.

9. Påvisning af de transformerede planters PTC-resistens.

Til undersøgelse af resistensgenets funktionalitet i transformerede planter overføres bladfragmenter af
25 transformerede og ikke-transformerede planter til M+S-næringsmedier med $1 \cdot 10^{-4}$ M L-PTC. Fragmenter af ikke-transformerede planter uddør, medens der på fragmenter af transformerede planter kan regenereres nye spirer. Transformerede spirer danner rod og vokser uden problemer på M+S-næringsmedier med $1 \cdot 10^{-3}$ M L-PTC. Transformerede planter
30 plantes under sterile betingelser i jord, og de sprøjtes med 2 kg/ha og 5 kg/ha PTC. Mens ikke-transformerede planter ikke overlever denne herbicidbehandling, viser de transformerede planter ingen af de skader, som herbicidet
35 bevirker. Udseendet og vækstforholdet af de sprøjtede, transformerede planter er mindst lige så godt som ved de usprøjtede kontrolplanter.

10. Acetyltransferase-undersøgelse til påvisning af PTC-acetyleringen i transgene, PTC-resistente planter.

Ca. 100 mg bladvæv fra transgene, PTC-resistente tobaksplanter eller fra ikke-transformerede tobaksplanter
5 homogeniseres i en puffer, der består af: 50 mM tris/HCl, pH 7,5; 2 mM EDTA; 0,1 mg/l leupeptin; 0,3 mg/ml okse-serumalbumin; 0,3 mg/ml DTT; 0,15 mg/ml phenylmethylnsulfonylfluorid (PMSF).

Efter en efterfølgende centrifugering inkuberes 20
10 μ l af den klare ovenstående væske med en 1 μ l 10 mM radioaktivt mærket D,L-PTC og 1 μ l 100 mM acetyl-CoA i 20 minutter ved 37°C. Herefter sættes 25 μ l 12% trichloreddikesyre til reaktionsblandingen, og der fracentrifugeres.
Fra den ovenstående væske overføres 7 μ l til en tyndtlagschromatografi-plade, og i en blanding af pyridin, n-butanol, eddikesyre og vand (50:75:15:60-rumfangsdele) fremkaldes opstigning to gange. PTC og acetyl-PTC adskilles
15 således fra hinanden, og de kan påvises ved autoradiografi.

Ikke-transformerede planter viser ingen omsætning af PTC
20 til acetyl-PTC, mens transgene, resistente planter er i stand dertil.

25

30

35

P A T E N T K R A V

1. Resistensgen, der koder for proteinet med aminosyresekvensen I, idet der som startcodon anvendes ATG og som stopcodon TGA, og genets GC-andel er tilpasset GC-andelen
5 i planter.
2. Resistensgen ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved DNA-sekvensen I (nucleotidposition 9-554).
3. Genstruktur, k e n d e t e g n e t ved, at DNA-sekvensen I er koblet til i planter aktive regulations- og
10 ekspressionssignaler.
4. Vektor, k e n d e t e g n e t ved resistensgenet ifølge krav 1 eller 2.
5. Vektor, k e n d e t e g n e t ved en genstruktur ifølge krav 3.
- 15 6. Vektorer indeholdende en eller flere DNA-sekvenser valgt blandt:
- I (nucleotid nr. 1-152)
II (nucleotid nr. 153-312)
III (nucleotid nr. 313-436) eller
20 IV (nucleotid nr. 437-558).
7. Værtscelle, k e n d e t e g n e t ved en vektor ifølge krav 4, 5 eller 6.
8. Plantecelle, k e n d e t e g n e t ved et gen
25 ifølge krav 1, 2 eller 3.
9. Planter, dele heraf og frø, k e n d e t e g n e t ved et gen ifølge krav 1, 2 eller 3.
10. Anvendelse af genet ifølge krav 1 eller 2 eller af genstrukturen ifølge krav 3 til tilvejebringelse af phos-
30 phinothricin-resistente planteceller, plantedele, planter og frø.