

(19) DANMARK



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) PATENTSKRIFT

(11) 168302 B1

(21) Patentansøgning nr.: 3251/89

(51) Int.Cl.5

C 12 N 15/87

(22) Indleveringsdag: 29 jun 1989

C 12 N 13/00

(41) Alm. tilgængelig: 30 dec 1990

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 07 mar 1994

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: -

(73) Patenthaver: *Danisco A/S; Langebrogade 1; 1411 København K, DK

(72) Opfinder: Morten *Jørsboe; DK

(74) Fuldmægtig: Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til indføring af molekyler, især genetisk materiale i planteceller

(56) Fremdragne publikationer

WO off.g.skrift nr. 89/02464

(57) Sammendrag:

3251-89

Fremgangsmåde til indføring af molekyler, især genetisk materiale, i cellemateriale, hvor et medium, der indeholder cellematerialet og molekylerne, udsættes for mild ultralyd-behandling. Der kan benyttes et apparat, som kan udsende ultralyd i et tidsrum op til 10.000 ms.

DK 168302 B1

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til indføring af molekyler, især genetisk materiale, i intakte planteceller.

5 Der kendes forskellige metoder til indføring af molekyler, såsom genetisk materiale, f.eks. plasmid-DNA, RNA, virus eller fragmenter deraf, i dyreceller og protoplaster.

10 Disse kendte metoder omfatter bl.a. kemiske metoder, elektroporation og mikroinjektion. Disse kendte metoder har vist sig at være anvendelige til både transient og stabil transformation. Alle de beskrevne metoder til opnåelse af transient expression har også vist sig at være anvendelige til frembringelse af stabile transformationer.

15

I forbindelse med indføring af genetisk materiale er der et vigtigt lighedspunkt mellem planteprotoplaster og dyreceller, idet begge udelukkende er afgrænset fra omgivelserne af en plasmamembran. I modsætning hertil omfatter intakte planteceller 20 udover en plasmamembran også en for højmolekylære forbindelser ugennemtrængelig cellevæg, der består af et tæt netværk af cellulosefibriller, pectin og ofte også lignin.

Ligheden mellem planteprotoplaster og dyreceller underbygges 25 af, at de metoder, som kendes til indføring af genetisk materiale i planteprotoplaster, sædvanligvis også kan anvendes på dyreceller.

Sådanne metoder omfatter:

30

Calciumphosphatudfældning af plasmid-DNA under dannelse af et krystallinsk produkt. Dette produkt kan optages af dyreceller (Graham og van der Eb, *Virology*, 52, 456-457, 1973) og af planteprotoplaster (Hain et al., *Mol. Gen. Genet.* 199, 161-168, 1985). 35

Indkapsling af plasmid-DNA med liposom med efterfølgende polyethylenglycolinduceret fusion med planteprotoplaster

(Deshayes et al., EMBO 4, 2731-2737, 1985), eller med dyreceller (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413, 1987).

5 Anvendelse af polyethylenglycol (PEG). Ved denne metode sættes der til planteprotoplaster og genetisk materiale polyethylenglycol, sædvanligvis 40% polyethylenglycol 6000 (Krens et al., Nature, 296, 72-74, 1982). På tilsvarende måde kan man anvende polyethylenimin eller poly-L-
10 ornithin.

Elektroporation. Her udsættes en suspension af dyreceller eller planteprotoplaster for en kortvarig elektrisk impuls med høj feltstyrke i nærværelse af genetisk materiale (Neuman et al., EMBO J., 1, 841-845, 1982; Fromm et al., Nature, 319, 791-793, 1986).
15

Mikroinjektion. Her indføres genetisk materiale i planteprotoplaster (Crossway et al., Mol. Gen. Genet., 20, 179, 1986) eller i dyreceller (Cappechi, Cell, 22, 479-488, 1980) ved hjælp af en ultratynd mikropipette.
20

Fra WO offentliggørelsesskrift nr. 89/02464 er det kendt at transformere dyreceller med DNA-fragmenter ved at give cellerne en ultralydsbehandling, der er tilstrækkelig til at traumatisere cellerne uden at slå cellerne ihjel. På grund af de tidligere nævnte ligheder mellem dyreceller og planteprotoplaster, må det anses for nærliggende, at denne metode også vil kunne anvendes til indføring af DNA-fragmenter i planteprotoplaster. Da imidlertid ingen af de tidligere nævnte metoder har vist sig at være egnede til indførelse af plasmid-DNA i intakte planteceller, vil fagmanden, der læser WO offentliggørelsesskriftet, drage den konklusion, at denne metode formentlig også vil kunne anvendes på protoplaster, men han vil
25 næppe komme på den tanke, at metoden vil kunne anvendes på
30 intakte, vanskeligt gennemtrængelige planteceller. Det er således almindeligt accepteret blandt fagfolk, at plantecellers
35

vægge generelt er uigennemtrængelige for store molekyler såsom DNA og proteiner.

5 For at løse dette problem har man derfor været nødt til først at fjerne plantecellernes cellevægge, sædvanligvis ved enzymatisk hydrolyse, for derefter at kunne indføre genetisk materiale i de derved dannede protoplaster. Dette giver sædvanligvis vanskeligheder, da det normalt er endnu vanskeligere at få protoplaster regenereret til hele planter sammenlignet med
10 anvendelse af intakte planteceller. Der er således et stort behov for at finde en metode, hvormed man kan indføre genetisk materiale direkte ind i intakte planteceller, således at man undgår problemerne med fremstilling af protoplaster og problemerne med regenerering ud fra protoplaster.

15

For nyligt er der udviklet en metode til indføring af plasmid-DNA i intakte planteceller. Denne er baseret på, at små partikler beklædt med plasmid-DNA skydes med en høj hastighed ind i de intakte planteceller (Klein et al., Nature, 327, 70-73,
20 1987). Denne metode kræver dog et meget kostbart udstyr, som endvidere kræver betydelig ekspertise for at kunne anvende det på rette måde.

Der er således et behov for en mere enkel og billig metode til
25 indføring af molekyler, især genetisk materiale, i intakte planteceller.

Det har nu vist sig, at indføring af molekyler, især genetisk materiale, i intakte planteceller kan gennemføres ved mild ultralydbehandling ved en metode, der kun kræver forholdsvis
30 billigt og let tilgængeligt udstyr og under opnåelse af en god effektivitet.

Det er således formålet med den foreliggende opfindelse at anvise en fremgangsmåde til indføring af molekyler, især genetisk materiale, i intakte planteceller på en billig og effektiv måde.
35

Dette opnås ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen der er ejendommeligt ved at et medium, der indeholder plantecellerne og molekylerne, udsættes for ultralydbehandling med en frekvens fra 5 kHz til 10 MHz, en udgangseffekt på op til 300 watt i et tidsrum på op til 10.000 ms.

5 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er et nyttigt alternativ til de tidligere kendte indføringemetoder. Med fremgangsmåden er der opnået en ny metode, der kun kræver beskedne omkostninger, og som kan gennemføres på en hurtig og simpel måde. På basis af de allerede gennemførte indføringforsøg kan man forudse, at fremgangsmåden også vil vise sin overlegenhed ved anvendelse på mange andre biologiske materialer, hvor de kendte metoder er utilstrækkelige.

10 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen underkastes plantecellerne en ultralydbehandling, der er betydeligt mildere end den ultralydbehandling, der benyttes til homogenisering eller lysis af celler. Det er således vigtigt at behandlingen er passende mild, således at en tilstrækkelig andel af plantecellerne bevarer levedygtigheden. For at sikre dette udsætter man plantecellesuspensionen for ultralydbølger i 20 frekvensområdet fra 5 kHz til 10 MHz, især fra 10 til 100 kHz, med en udgangseffekt (dvs. den til det lydgivende organ tilførte elektriske effekt) på op til 300 watt, såsom 5-300 watt, fortrinsvis 30-70 watt, i et tidsrum på op til 10.000 ms, såsom 100-3000 ms, fortrinsvis 400-1000 ms.

25 Som eksempler på molekyler, der kan indføres i planteceller ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan nævnes DNA, plasmid-DNA, RNA, virus, proteiner, lipider, lægemidler, små molekyler, organeller eller fragmenter af sådanne materialer.

30 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen har med fordel været anvendt til indføring af molekyler i planteceller fra sukkerroe og tobak.

35 Et fordelagtigt medium, hvori plantecellerne og molekylerne er indeholdt under ultralydbehandlingen, er en vandig saltopløsning (CPW), som er nærmere beskrevet nedenfor i forbindelse med eksemplerne, indeholdende 21-28% saccharose.

Ved indføring af plasmid-DNA ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen opnås særligt gode resultater, hvis mediet indeholder plasmid-DNA i en koncentration på mindst 10 µg/ml.

5 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan man med fordel gennemføre den milde ultralydbehandling under anvendelse af et spidst lydgivende organ, som kun neddyppes i den øvre del af mediet.

10 Ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er der påvist indføring af molekyler i tokimbladede planteceller, såsom sukkerroe og tobak. Det må dog formodes, at fremgangsmåden er lige så velegnet til indførelse af molekyler i enkimbladede planteceller.

15

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan med fordel gennemføres ved anvendelse af et apparat, der omfatter et lydgivende organ, der i et medium kan udsende ultralyd i et tidsrum på op til 10.000 ms. Et sådant apparat kan med fordel være udformet
20 til at udsende ultralydbølger med en frekvens i området fra 10 til 100 kHz.

Til løsning af forskelligartede opgaver kan apparatet være udformet således, at den til det lydgivende
25 organ tilførte effekt kan indstilles på en hvilken som helst værdi i området fra 5 til 300 watt og således, at lydbehandlingsens varighed er indstillelig i området fra 100 ms til 10.000 ms.

30 Apparatets lydkilde er med fordel udformet således, at den kan neddyppes i et medium, der er placeret i en passende beholder, såsom et Eppendorfrør. En sådan udformning, hvor det lydafgivende organ sidder for enden af en tynd stav, er kendt fra konventionelle ultralydapparater beregnet til nedbrydning
35 eller lysis af cellemateriale.

Det har ved forsøg vist sig at sådanne konventionelle ultralydapparater kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

sen. Den foreliggende opfindelse er udviklet under anvendelse af et i handelen tilgængeligt apparat med betegnelsen Sonifier B 15, der leveres af Branson, Eagle Road, Danbury, Connecticut, USA, beregnet til lysis af celler. Apparatet kan udsende ultralyd med en frekvens på 20 kHz. De i nærværende beskrivelse og krav angivne effekter i watt er udgangseffekten, så-
5 dan som den aflæses på udgangskontrolskalaen (output control). Ved forsøgene var det ultralydgivende organ neddyppet ca. 2-3 mm fra overfladen. Ved orienterende forsøg under anvendelse af et kalorimeter har det vist sig, at der ved den benyttede forsøgsopstilling opnås en afsat effekt til væsken, som er på ca. 5 til 10% af den angivne udgangseffekt. Ved anvendelse af andre apparater vil fagmanden på samme måde som beskrevet i de efterfølgende eksempler kunne bestemme en passende indstilling, som giver en mild ultralydbehandling med effektiv indføring af molekyler, under opretholdelse af en tilstrækkelig levedygtighed, det vil sige en indstilling, som giver en ultralydbehandlingseffekt svarende til den, der er anvendt i de ifølge eksemplerne foretagne forsøg. Det kan til sammenligning
10 oplyses, at når det nævnte apparat Sonifier B 15 anvendes til lysis eller homogenisering af celler under i øvrigt samme betingelser, indstiller man det sædvanligvis på en udgangseffekt på 80-100 watt og en behandlingstid på 30.000 til 250.000 ms ved behandling af intakte celler.

25 Som tidligere nævnt kendes der flere metoder til indføring af genetisk materiale i planteceller, hvor disse først omdannes til planteprotoplaster, idet der opnås en højere grad af indføring af det genetiske materiale i protoplasterne, da disse ikke har den spærrende cellevæg. Til gengæld er det for protoplaster af en række plantearter, især enkimbladede planter, vanskeligt at regenerere protoplaster til intakte planter. Selv om der er opnået gunstige resultater med protoplaster af visse plantearter er der andre plantearter, hvor det vil være
35 mere fordelagtigt at benytte intakte planteceller, plantekim eller andet morfogent materiale i stedet for protoplaster. Det er ved forsøg påvist, at direkte indføring af genetisk

materiale i intakte celler ved mild ultralydbehandling ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er mulig og attraktiv, da der her er tale om en mindre kompliceret metode, der giver mulighed for en drastisk forøgelse af det antal af plantearter, hvor der med succes kan gennemføres genetisk manipulation.

Som genetisk materiale kommer navnlig DNA eller fragmenter deraf, såsom plasmid-DNA, på tale. Det må imidlertid antages, at fremgangsmåden også er velegnet til indføring af RNA eller fragmenter deraf samt til indføring af virus, f.eks. til patologiske undersøgelser. Ligeledes vil fremgangsmåden ifølge opfindelsen formentlig også kunne anvendes til indføring af proteiner, lipider, lægemidler, små molekyler samt organeller og viruspartikler i celler.

Som medium kan der anvendes et hvilket som helst passende konventionelt medium for celler eller protoplaster.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen benytter en teknik, hvor der antageligt sker en midlertidig, moderat svækkelse af såvel cellemembran som cellevæg, hvilket i de efterfølgende eksempler er påvist hos intakte planteceller. Således påvises det i eksemplerne, at plasmid-DNA kan trænge ind i ultralydbehandlede planteceller.

Omfanget af opfindelsens anvendelighed vil fremgå af den efterfølgende detaljerede beskrivelse.

30

35

Eksempler

Generelle forsøgsbetingelser:

5 Cellesuspensionskultur

En cellesuspensionskultur af sukkerroe (*Beta vulgaris* L.) af genotypen M1 (fra DANISCO A/S, København, Danmark) fremstilles ud fra callus opnået fra kim (embryo). Cellesuspensionen dyrkes i mørke ved 25°C på et roterende rysteapparat. Cellerne opretholdes ved subdyrkning i et medium ifølge Murashige og Skoog (*Physiol. Plant.* 15, 473-497, 1962) suppleret med 5,7 µM indoleddikesyre og 4,4 µM benzyladenin.

15 CPW

CPW er en vandig opløsning af en blanding af uorganiske salte omfattende blandt andet ca. 10 mM Ca⁺⁺ beskrevet af Frearson et al., (*Dev. Biol.* 33, 130-137, 1973).

20

Ultralydbehandling

En cellesuspension til ultralydbehandling fremstilles ved at udtage cellerne 3-4 dage efter subdyrkning og vaske to gange i CPW 13S (dvs. CPW indeholdende 13% sorbitol) og suspendering til sidst i CPW 13S i forholdet 1 rumfang celler til 4 rumfang CPW 13S. Til denne suspension i 0,35 ml CPW indeholdende 21% saccharose og indeholdende planteceller (500.000/ml) i et Eppendorfrør sættes plasmid DNA til en slutkoncentration på 45 µg/ml. Som plasmid DNA anvendes et plasmid, der koder for markør-enzymet chloramphenicol-acetyltransferase (CAT). Det anvendte plasmid er plasmidet pCaMVCN, der med kodebetegnelsen 27-4909 leveres af Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sverige.

35

Efter hurtig omrystning neddyppes mikrotippen af en Sonifier B 15 (leveret af Branson, Eagle Road, Danbury, Connecticut, USA)

i den øvre halvdel af celled suspensionen (dvs. 2-3 mm fra overfladen). Der tilføres en ultralydimpuls med en frekvens på 20 kHz. Den effekt, der angives i forsøgene bestemmes ud fra udgangskontrolskalaen (output control), hvor en enhed svarer til 15 watt elektrisk effekt. Den effektive akustiske effekt er blevet målt til 0,22 watt/cm² ved 10 watt elektrisk effekt. Behandlingens varighed indstilles ved hjælp af skalaen for procent driftscyklus (procent duty circle), hvor man ved en indstilling på 10% opnår, at en ultralydimpuls varer i 110 ms.

10

Derefter overføres de ultralydbehandlede celler til petriskåle med et MS-medium (Murashige og Skoog, se ovenfor) og der inkuberes ved 23°C i 2 dage. Derefter påvises tilstedeværelsen af CAT-aktivitet i en ekstrakt udvundet fra de behandlede celler ved tilsætning af ¹⁴C-mærket chloramphenicol og opvarmning i 6 minutter til 60°C. Efter afkøling tilsættes acetyl-coenzym A til prøven, således at slutkoncentrationen af acetyl-coenzym A bliver 0,71 mM. Indføringen af plasmidet bedømmes ved måling af den procentuelle omdannelse af chloramphenicol (CA). Den anvendte metode er en modifikation af den metode, der er beskrevet af Gorman et al. (Mol. Cell. Biol. 2, 1044-1051, 1982).

20

Eksempel 1

25

Nærværende eksempel belyser indføring af plasmid-DNA i intakte celler af sukkerroe af genotypen M1.

30

Suspensionskulturer af sukkerroeceller opretholdes ved subdyrkning som beskrevet ovenfor og ultralydbehandles, dyrkes og analyseres på den beskrevne måde. Resultaterne fra den målte CAT-aktivitet fremgår af tabel 1.

35

Tabel 1
Sukkerroe

	Effekt (watt)	Tid (ms)	Omdannelse af CA (%)
5	0	0	0,03
	60	800	0,06
	75	800	0,21
	90	800	0,17
	105	800	0,07

10

Eksempel 2

Nærværende eksempel belyser indføring af plasmid-DNA i intakte celler af tobak.

15

En cellesuspensionskultur af tobak opretholdes ved subdyrkning på samme måde som beskrevet ovenfor for subdyrkning af celled suspensionerne af sukkerroe, idet dog dyrkningsmediet består af et medium ifølge Murashige og Skoog (Physiol. Plant. 15, 473-497, 1962) suppleret med 0,2 mg/l 2,4-dichlorphenoxyeddikesyre, 0,1 mg/l kinetin, 0,9 mg/l thiaminhydrochlorid og 0,2 g/l KH_2PO_4 , pH 6,0.

20

Cellerne udtages 3-4 dage efter subdyrkning og vaskes to gange i CPW13S (dvs. CPW indeholdende 13% sorbitol) og suspenderes til sidst i CPW13S i forholdet 1 rumfang celler til 4 rumfang CPW13S. Herfra udtages prøver på 0,35 ml, som hver tilsættes plasmidet pCaMVCN til en slutkoncentration på 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Derefter underkastes cellerne ultralydbehandling under de i tabel 2 angivne betingelser. Efter dyrkning i 2 dage i det ovennævnte medium ekstraheres cellerne, og CAT-aktiviteten måles. Resultaterne ses i tabel 2.

25

30

35

Tabel 2

	Tobak		
	Effekt	Tid	Omdannelse af CA
	(w)	(ms)	(%)
5	0	0	0,05
	75	570	0,06
	75	800	0,13
	75	1000	0,07

10 Det fremgår, at fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan anvendes til indføring af molekyler i intakte planteceller.

15 Idet opfindelsen nu er blevet beskrevet, vil det være åbenbart, at denne vil kunne varieres på mange måder. Sådanne variationer skal ikke betragtes som en afvigelse fra opfindelsens idé og rammer, og alle sådanne modifikationer, som vil være nærliggende for fagfolk, skal også forstås som omfattet af de efterfølgende kravs rammer.

20 P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til indføring af molekyler, især genetisk materiale, i intakte planteceller, k e n d e t e g n e t
25 ved, at et medium, der indeholder plantecellerne og molekylerne, udsættes for ultralydbehandling med en frekvens fra 5 kHz til 10 MHz, en udgangseffekt på op til 300 watt i et tidsrum på op til 10.000 ms.

30 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at ultralydbehandlingen foretages med en udgangseffekt på 5-300 watt i et tidsrum på 100-3000 ms.

35 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at ultralydbehandlingen foretages med en udgangseffekt på 30-70 watt i et tidsrum på 400-1000 ms, og at frekvensen for lydbølgerne ligger i området fra 10 til 100 kHz.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at molekylerne er valgt blandt DNA, plasmid-DNA, RNA, virus, proteiner, lipider, lægemidler, små molekyler, organeller eller fragmenter af sådanne materialer.

5

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at mediet har en plasmid-DNA-koncentration på mindst 10 µg/ml.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at ultralydbehandlingen foretages med et spidst lyd-givende organ, som kun neddyppes i den øvre del af mediet.

10

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at plantecellerne er fra en enkimbladet plante.

15

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at plantecellerne er fra en tokimbladet plante.

9. Fremgangsmåde ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at plantecellerne er celler fra sukkerroe eller tobak.

20

25

30

35

Fig. 1

