



SUOMI - FINLAND  
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS  
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU  
PATENTSKRIFT



(10) FI 116067 B

(45) Patenti myönnetty - Patent beviljats

15.09.2005

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12N 15/01, 15/82 // A01H 1/00

(21) Patentihakemus - Patentansökning

880216

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

19.01.1988

(24) Alkuperäpäivä - Löpdag

19.01.1988

(41) Tullut julkiseksi - Blivt offentlig

22.07.1988

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

21.01.1987 DE 3701624 P 07.11.1987 DE 3737918 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •Hoechst Aktiengesellschaft, 65926 Frankfurt am Main, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

- 1 •Strauch,Eckhard, Rosenheide 2, 33611 Bielefeld, SAKSA, (DE)
- 2 •Arnold,Walter, Am Gottesberg 25, 33619 Bielefeld, SAKSA, (DE)
- 3 •Aijah,Renate, Kösterkamp 14, 33739 Bielefeld, SAKSA, (DE)
- 4 •Wohlleben,Wolfgang, Menzelstrasse 1, 33613 Bielefeld, SAKSA, (DE)
- 5 •Pühler,Alfred, Am Waldschlöschchen 2, 33739 Bielefeld, SAKSA, (DE)
- 6 •Eckes,Peter, Am Flachsland 18, 65779 Kelkheim (Taunus), SAKSA, (DE)
- 7 •Donn,Günter, , Sachsenring 35, 65719 Hofheim am Taunus, SAKSA, (DE)
- 8 •Uhlmann,Eugen, Zum Talblick 31, 61479 Glashütten/Taunus, SAKSA, (DE)
- 9 •Hein,Friedrich, Erlesring 40, 65795 Hattersheim am Main, SAKSA, (DE)
- 10 •Wengenmayer,Friedrich, Am Seyenbach 38, 65719 Hofheim am Taunus, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab  
Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Kasveissa tehokas fosfinotrisiiniresistenssigeeni ja sen käyttö  
i växter verksam fosfinotricinresistensgen och dess användning**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

---

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee kasveissa tehokasta fosfinotrisiiniresistenssigeeniä ja sen käyttöä. Ko.resistenssigeeni saadaan menetelmällä, jossa syntetisoidaan Streptomyces viridochromogenes DSM 40736:n genomista eristetty fosfinotrisiini(PTC-)resistenssigeeni, kun on ensin tehty kodonienkäytön mukauttaminen kasveille sopivaksi, ja sijoitetaan se geenirakenteisiin, jotka ilmentyytään kasveissa tekevät niistä PTC-resistenttejä.

Uppfinningen avser en i växter effektiv fosfinotricinresistensgen och användningen av densamma. Ifrågavarande resistensgen erhålls medelst ett förfarande, enligt vilket den ur genomet av Streptomyces viridochromogenes DSM 40736 isolerade fosfinotricin (PTC)-resistensgenen - efter anpassning till kodonanvändningen i växter - syntetiseras och inbyggs i genstrukturer, vilka efter expression i växter gör dessa resistent mot PTC.

## Kasveissa tehokas fosfinotrisiiniresistenssigeeni ja sen käyttö

DE-patenttihakemuksessa P 36 28 747.7 ehdotetaan  
5 fosfinotrisiini (PTC-) resistenssigeeniä, joka on saatavissa fosfinotrisyyli-alanyyli-alaniini (PTT-) resistenssin perusteella valikoidun *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736:n (yleinen kokoelma) tai DSM 4112:n (talletettu Budapestin sopimuksen ehdoilla) kokonais-DNA:sta pilkkomalla  
10 BamHI:llä, kloonamalla 4,0 ke:n kokoinen fragmentti ja valikoimalla PTT-resistenssin mukaan, samoin kuin tämän geenin käyttöä PTC-resistenttien kasvien valmistukseen; PTT-resistenttimarkkerina bakteereissa ja PTC-resistenssimarkkerina kasvisoluissa. 4 ke:n kokoisen BamHI-fragmentin,  
15 jossa resistenssigeeni sijaitsee, määrittelee tarkemmin restriktiokartta (kuvio 1).

Koodausalueen sijaintikohta rajattiin tarkemmin kloonamalla tämän 4 ke:n fragmentin osa-alueita. Tällöin kävi ilmi, että resistenssigeeni sijaitsee 1,6 ke:n kokoisessa SstII - SstI -fragmentissa (asemat 0,55 - 2,15 päähakemuksen kuvassa 1). Pilkkomalla BglII:lla saadaan 0,8 ke:n kokoinen fragmentti, joka plasmidiin sijoittamisen ja *S. lividansin* transformoinnin jälkeen välittää PTT-resistenssin. Tämä resistenssi vaatii PTC:n N-asetyylatiota.  
25 Resistenssigeeni koodaa siten asetyylitransferaasia.

Lisähakemuksessa P 36 42 829.9 esitetään edellä mainitun 0,8 ke:n fragmentin DNA-sekvenssi. Sekvenssistä voidaan määrittää geenisekvenssin aloituskodoni ja avoin lukukehys. Viimeinen nukleotidi on osa lopetuskodonista  
30 TGA.

*Streptomyceettigeeneissä* G:n + C:n osuus on sängen suuri; suhde adeniini (A) + tymiini (T) : guaniini (G) + sytosiini (C) on noin 30 % : 70 %. Kasvien geenien GC-osuus on paljon pienempi, noin 50 %. Tästä syystä keksinnön  
35 lisäsuoritusmuodossa resistenssigeenin DNA-sekvenssi

optimoitiin synteessillä kodonien käytöltään kasvien RNA-polymeraasi II:lle edulliseksi.

Keksintö koskee DE-patenttihakemuksessa P 36 28 747.7 ja lisähakemuksessa P 36 42 829.9 ehdotetun resistenssi-  
5 geenin muuntamista, nimittäin mukauttamista kasvien kodonienkäyttöön. Vastaava aminohapposekvenssi annetaan liitteessä. Keksinnön muut suoritusmuodot määritellään patenttihakemuksissa tai niitä valaistaan seuraavassa.

Geneettinen koodi on tunnetusti degeneroitunut,  
10 ts. vain kahta aminohappoa koodaa yksi ainoa tripletti, kun taas loppuja 18 geneettisesti koodattavissa olevaa aminohappoa vastaa 2 - 6 triplettiä. Geenin synteesiä varten on siten teoriassa valittavissa suuri joukko kodoniyhdistelmiä. Koska yksittäisten nukleotidien suhteellisella  
15 osuudella kokonais-DNA-sekvenssissä on merkitystä, asetettiin se erääksi kriteeriksi sekvenssin optimoinnissa.

Sekvensoituun geeniin tehtiin seuraavat muutokset:

1. Streptomykeettigeenien aloituskodoni GTG (asemat 258 - 260 lisähakemuksen mukaisessa sekvenssissä)  
20 vaihdettiin kasvien RNA-polymeraasi II:n käyttämäksi aloituskodoniksi ATG.

2. Geenin sisällä muutettiin streptomykeettigeenikodoneja sillä tavalla, että tuloksena oli kasvigeeneihin soveltuvia kodoneja (G/C-suhde).

25 3. Luentatapahtuman lopettamista varten sijoitettiin sekvenssin päähän TGA-lopetuskodoni.

4. Geenisekvenssin alku ja loppu varustettiin restriktiokohtien yksisäikeisillä päillä geenin amplifioimisen ja kasvien säätelysekvenssien väliin ligatoimisen  
30 mahdollistamiseksi.

5. Palindromisekvenssien määrä tehtiin mahdollisimman pieneksi.

Keksinnön mukainen DNA-sekvenssi I (ja vastaava aminohapposekvenssi) esitetään liitteessä.

35 Kolme sisäistä yhden kerran esiintyvää pilkkoutumiskohtaa, jotka vastaavat restriktioentsyymejä XbaI (ase-

ma 152), BamHI (312) ja XmaI (436), mahdollistavat sel-  
 laisten osasekvenssien alakloonauksen, jotka voidaan si-  
 joittaa hyvin tutkittuihin kloonauksvektoreihin, kuten esi-  
 merkiksi pUC18:aan tai pU19:ään. Lisäksi geenin alueelle  
 5 sijoitettiin joukko muita yhden kerran esiintyviä restriktio-  
 entsyymien tunnustuskohtia, jotka mahdollistavat toi-  
 saalta asetyylitransferraasiosasekvenssien saannin ja toi-  
 saalta muutosten tekemisen.

10	Restriktio- entsyymi	Katkaisukohtaa edeltävän nuk- leotidin nro(koodaava säie)
	BspMII	11
	SacII	64
15	EcoRV	74
	HpaI	80
	AatII	99
	BstXI	139
	ApaI	232
20	ScaI	272
	AvrII	308
	AflII	336
	StuI	385
	BssHII	449
25	FokI	487
	BglI	536
	BglII	550

Osasekvenssien muodostaminen kemiallisesti synte-  
 30 tisoimalla ja entsyymattisten ligaatioreaktioiden avulla  
 tapahtuu sinänsä tunnetulla tavalla (EP-hakemusjulkaisut  
 0 133 282, 0 136 472, 0 155 590, 0 161 504, 0 163 249,  
 0 171 024, 0 173 149 ja 0 177 827). Yksityiskohtia, kuten  
 restriktioanalyysijä, DNA-fragmenttien ligatointeja ja E.  
 35 colin transformointia plasmideilla kuvataan perusteelli-

sesti Maniatisin et al. oppikirjassa (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor 1982).

Siten kloonattu geenisekvenssi viedään sitten kasveihin kasvien säätelysignaalien ohjauksen alaiseksi ja  
 5 saatetaan ilmentymään. EP-hakemusjulkaisussa 0 122 791 esitetään katsaus tunnettuihin menetelmiin. Siten saadaan PTC-resistenttejä kasvisoluja (ts. käytettävissä on transformoituneiden solujen valikointimarkkeri), kasveja tai kasvinosia ja siemeniä.

10 Keksinnön joitakin suoritusmuotoja valaistaan yksityiskohtaisesti seuraavissa esimerkeissä. Prosenttisuu-  
 det ovat tässä yhteydessä painoprosentteja, ellei toisin mainita.

#### **Esimerkit**

15 Käytettiin seuraavia kasvualustoja:

##### a) Bakteereille:

YT-alusta: 0,5 % hiivauutetta, 0,8 Bacto-tryptonia,  
 0,5 % NaCl:a

LB-alusta: 0,5 % hiivauutetta, 1 % Bacto-tryptonia,  
 20 1 % NaCl:a

Kiinteä alusta: lisättiin kulloinkin 1,5 % agaria

##### b) Kasveille:

M + S -alusta: katso Murashige ja Skoog, Physiologica  
 Plantarum 15 (1982) 473

25 2Ms-alusta: M + S -alusta, joka sisältää 2 % sakkaroosia

MSC10-alusta: M + S -alusta, joka sisältää 2 % sakkaroosia, 500 mg/l kefotaksiimia, 0,1 % mg/l naftyylietikkahappoa (NAA), 1 mg/l bentsyyliaminopuriinia (BAP) ja 100 mg/l kanamysiiniä,  
 30

MSMSC15-alusta: M + S -alusta, joka sisältää 2 % sakkaroosia, 500 mg/l kefotaksiimia ja 100 mg/l kanamysiiniä.

### 1. Yksisäikeisen oligonukleotidin kemiallinen synteesi

Fragmentin II, joka on yksi neljästä osafragmentista I - IV, synteessin lähtöaineena toimi pääteasemassa  
5 oleva oligonukleotidi IIc (DNA-sekvenssin I koodaavan säikeen nukleotidit 219 - 312). Kiinteäfaasisynteesiä varten sidotaan 3'-päässä oleva nukleosidi, tässä tapauksessa siis guanosiini (nukleotidi nro 312), 3'-pään funktionaalisen hydroksyyli-ryhmän kautta kovalenttisesti kantajaan.  
10 Kantajamateriaali on pitkäketjuisia aminoalkyyli-ryhmiä funktionaalisina ryhminä sisältävä CPG ("Controlled Pore Glass"). Synteesisissä noudatetaan muuten tunnettuja menetelmiä (mainittu EP-hakemusjulkaisu, sivu 4, palstat 1 - 2).

Synteesisuunnitelma esitetään DNA-sekvenssin II  
15 (liite) yhteydessä, joka muuten vastaa DNA-sekvenssiä I.

### 2. Yksisäikeisen oligonukleotidin entsyymaattinen kytkeminen geenifragmenttiin II

Oligonukleotidien 5'-pään fosforyloimiseksi käsiteltiin kulloinkin 1 nmol oligonukleotidia IIb ja IIc  
20 seoksella, joka sisälsi 5 nmol adenosiniitri-fosfaattia ja 4 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia 20 µl:ssa 50 mM Tris-HCl-puskuria (pH 7,6), joka sisälsi 10 nM magnesiumkloridia ja 10 mmol/l ditiotreitolia (DTT), 30 min lämpötilassa 37 °C. Entsyymi deaktivoidaan pitämällä seosta 5 min 95  
25 °C:n lämpötilassa. Oligonukleotideja IIa ja IID, jotka muodostavat DNA-fragmentissa II "ylimääräisen" sekvenssin, ei fosforyloida. Tämä estää myöhemmässä ligaatiossa suurempien kuin DNA-fragmenttia II vastaavien alafragmenttien muodostumisen.

30 Oligonukleotidit IIa - IID ligatoidaan alafragmenttien II seuraavasti: Oligonukleotideja IIa ja IID samoin kuin IIb:n ja IIc:n 5'-fosfaatteja (1 nmol kutakin) liuotetaan yhdessä 45 µl:aan puskuria, joka sisältää 50 mmol/l Tris-HCl:a (pH 7,6), 20 mmol/l magnesiumkloridia, 25  
35 mmol/l kaliumkloridia ja 10 mmol/l DTT:tä. Oligonukleotidien pariuttamiseksi DNA-fragmenttiin II pidetään oligo-

nukleotidiliuosta 2 min lämpötilassa 95 °C ja jäähdytetään sitten hitaasti (2 - 3 tuntia) lämpötilaan 20 °C. Entsymaattisen kytkemisen tekemiseksi lisätään sitten 2 µl 0,1 M DTT-liuosta, 8 µl 2,5 mM adenosiinitrifosfaattiliuosta (pH 7) sekä 5 µl T4-ligaasiliuosta (2000 yksikköä), ja inkuboidaan 16 tuntia lämpötilassa 22 °C.

Geenifragmentti II puhdistetaan geelielektroforeettisesti 10-%:isella polyakryyliamidigeelillä (ilman ureaa, 20 x 40 cm, paksuus 1 mm), jolloin markkeriaineena käytettiin HinfI:llä pilkottua ØX 174-DNA:ta (valmistaja BRL) tai HaeIII:lla pilkottua pBR322:a.

Geenifragmentit I, III ja IV valmistetaan samalla tavalla, mutta muutetaan "ylimääräiset" sekvenssit 5'-fosfaateiksi ennen pariuttamista, sillä ligaatiovaihetta ei tarvita.

### **3. Geenifragmentit I, II, III ja IV sisältävien hybridiplasmidien valmistus**

a) Geenifragmentin I sijoittaminen pUC18:aan

Kaupallisesti saatavissa oleva plasmidi pUC18 avataan tunnetulla tavalla restriktioendonukleasaaseilla SalI ja XnaI valmistajan ohjeiden mukaisesti. Pilkkomisprosessilla tehdään erotus käsittelemällä se elektroforeettisesti 1-%:isella agarosigeelillä, ja fragmentit visualisoidaan värjäämällä etidiumbromidilla. Plasmidiväyöhyke (noin 2,6 ke) leikataan sitten irti agarosigeelistä ja erotetaan agarosista elektroeluutiolla.

1 µg XbaI:llä ja SalI:llä avattua plasmidia ligatoidaan sitten yön yli lämpötilassa 16 °C DNA-fragmentin I (10 ng) kanssa.

b) Geenifragmentin II sijoittaminen pUC18:aan

pUC18 pilkotaan XbaI:llä ja BamHI:llä kohdan a) mukaisesti, ja tehdään ligaatio geenifragmentin II kanssa, jonka yksisäikeiset päät on fosforyloitu ennalta esimerkiksi 2 kuvatulla tavalla.

35

c) Geenifragmentin III sijoittaminen pUC18:aan  
pUC18 pilkotaan XmaIII:lla ja SalI:llä kohdassa a)  
kuvatulla tavalla, ja tehdään ligaatio geenifragmentin IV  
kanssa.

5           **4. Täydellisen geenin muodostaminen ja kloonami-  
nen pUC-plasmidissa**

a) Geenifragmenttien I - IV transformointi ja  
amplifiointi

Siten saaduilla hybridiplasmideilla transformoi-  
10 daan E. coli. Tätä varten tehdään E. coli -kannasta K 12  
kompetentti käsittelemällä 70 mM kalsiumkloridiliuoksella,  
ja lisätään hybridiplasmidin suspensiota 10 mM Tris-HCl-  
puskurissa (PH 7,5), joka sisältää 70 mmol/l kalsiumklori-  
dia. Transformoituneet kannat valikoidaan tavanomaisesti  
15 käyttämällä hyväksi plasmidin välittämiä antibioottiresis-  
tenssejä tai -herkkyksiä, ja lisätään hybridivektoreita.  
Solujen tappamisen jälkeen eristetään hybridiplasmidit,  
pilkotaan alunperin käytetyillä restriktioentsyymeillä, ja  
eristetään geenifragmentit I, II, III ja IV geelielektro-  
20 foreesilla.

b) Geenifragmenttien I, II, III ja IV liittäminen  
yhteen

Amplifikaatiossa saadut alafragmentit I ja II lii-  
tetään seuraavasti. Eristetyt fragmentit I ja II (100 ng  
25 kumpaakin) liuotetaan yhdessä 10 µl:aan puskuria, joka si-  
sältää 50 mmol/l Tri-HCl:a (pH 7,6), 20 mmol/l magnesium-  
kloridia ja 10 mmol/l DTT:tä, ja pidetään tätä liuosta 5  
min lämpötilassa 57 °C. Kun liuos on jäähtynyt huoneen  
lämpötilaan, lisätään 1 µl 10 mM adensiinitrifosfaatti-  
30 liuosta (pH 7) ja 1 µl T4-DNA-ligaasiliuosta (400 yksik-  
köä), ja inkuboidaan 16 tuntia huoneenlämpötilassa. Kun  
tuote on pilkottu restriktioentsyymeillä SalI ja BamHI,  
puhdistetaan haluttu 312 ep:n fragmentti (nukleotidit 1 -  
212, SalI-BamHI) tekemällä geelielektroforeesi 8-%:isella  
35 polyakryyliamidigeelillä, jolloin käytetään markkeriaine-



na restriktioentsyymillä HaeIII pilkottua ØX 174 RF -DNA:ta (valmistaja BRL).

Geenifragmentit III ja IV kytketään toisiinsa samalla tavalla, jolloin puhdistuksen jälkeen saadaan 246 ep:n fragmentti (nukleotidit 313 - 558, BamHI - SalI).  
5 Geelielektroforeesissa käytetään markkerina restriktioentsyymillä MspI pilkottua pBR322:a.

Kokonaisen geenin (DNA-sekvenssin I) muodostamiseksi ligatoidaan 15 ng 312 ep:n fragmenttia ja 12 ng 246 ep:n fragmenttia 1 µg:n kanssa kaupallista plasmidia pUC18, joka on ennalta pilkottu restriktioentsyymillä SalI ja jonka päät on defosforyloitu entsyymattisesti, edellä kuvatulla tavalla. Esimerkissä 4a kuvatulla tavalla tehdyn transformoinnin ja ampilifioinnin jälkeen identifioidaan  
10 SalI-pilkkomisen avulla oikea klooni, jossa on DNA-sekvenssin I mukainen 558 ep:n fragmentti.

#### **5. Hybridiplasmiditransformaatio**

Kompetentit E. coli -solut transformoidaan 0,1 - 1 µg:lla hybridiplasmidia, joka sisältää DNA-sekvenssin I, ja siirrostetaan ampicilliinia sisältäville agarmaljoille.  
20 Sen jälkeen voidaan kloonit, jotka sisältävät plasmidissa oikein integroituneita sekvenssejä, identifioida DNA-pikäsittelyllä (Maniatis, loc. cit.).

#### **6. Syntetisoidun geenin fuusiointi säätelysignaaleihin, jotka tulevat tunnistetuiksi kasveissa.**

Optimoitu resistenssigeeni, jonka päitä on varustettu SalI-pilkkoutumiskohdilla, ligatoitiin plasmidin pDH51 [Pietrzak et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 5857] polykytkijäsekvenssin SalI-pilkkoutumiskohtaan. Tämä plasmidi sisältää kukkakaalin mosaiikkiviruksen 35S-transkriptin promoottorin ja terminaattorin, jotka kasvien transskriptiojärjestelmä tunnistaa.  
30

Resistenssigeeni insertoitiin 35S-transskriptin promoottorin taakse ja terminaattorin eteen tekemällä liigaatio. Geenin oikea orientaatio varmistettiin restriktioanalyysillä.  
35

Solanum tuberosumin ST-LS1-geeniä [Eckes et al., Mol. Gen. Genet. 205 (1986) 14] promoottoria käytettiin samoin optimoidun asetyylitransferaasigeenin saattamiseen ilmentymään kasveissa.

5           **7. Resistenssigeenin sijoittaminen yhdessä sääte-**  
**lysekvenssien kanssa Agrobacterium tumefaciensin**

a) Kointegraattimenetelmä

Koko promoottorista, optimoidusta resistenssi-  
 geenistä ja terminaattorista (esimerkki 6) koostuva trans-  
 10 skriptioyksikkö (esimerkki 6) pilkottiin restriktioentsyy-  
 millä EcoRI ja ligatoitiin E. coli -välivaihevektorin  
 pMPK110 (Peter Eckes, Dissertation, Univ. Köln 1985, s.  
 91) EcoRI-pilkkoutumiskohtaan. Tämä välivaihevektori oli  
 välttämätön resistenssigeenin siirtämiseksi sääteleyse-  
 15 vensseineen Agrobacterium tumefaciensin Ti-plasmidiin. Tämä  
 niin kutsuttu konjugaatio tehtiin Van Hauten et al. [EMBO J.  
 2 (1983) 411] kuvaamalla menetelmällä. Tällöin geeni in-  
 tegroitiin säätelysignaaleineen Ti-plasmidiin tekemällä  
 homologinen rekombinaatio pMPK110-vektorissa ja Ti-plas-  
 20 midissa pGV3850kanR [Jones et al., EMBO J. 4 (1985) 2411]  
 esiintyvien standardivektorin pBR322 sekvenssien kautta.

Tämän aikaansaamiseksi sekoitettiin E. coli -kan-  
 nan DH1 (PMPK110-johdannaisen isäntäkanta) ja GJ23:n [Van  
 Heute et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986) 5857] tuoreita  
 25 nesteviljelmiä (50 µl kumpaakin) kuivalla YT-agarmaljalla,  
 ja inkuboitiin 1 tunti lämpötilassa 37 °C. Bakteerit sus-  
 pendoitiin takaisin 3 ml:aan 10 mM MgSO<sub>4</sub>-liuosta ja siir-  
 rostettiin antibiottiagarmaljoille (50 µg/ml spektinomy-  
 siiniä, valikointi pMPK110:n suhteen; 10 µg/ml tetrasyk-  
 30 liiniä, valikointi R64drd11:n suhteen; 50 µg/ml kanamysii-  
 niä, valikointi pGJ28:n suhteen). Selektiivisillä agarmal-  
 joilla kasvavat bakteerit sisälsivät nämä kolme plasmidia,  
 ja niitä lisättiin nestemäisessä YT-alustassa lämpötilassa  
 37 °C Agrobacterium tumefaciensin kanssa tehtävää konju-  
 35 gaatiota varten. Agrobakteereja kasvatettiin LB-alustassa  
 lämpötilassa 28 °C. Bakteerisuspensioita (50 µl kutakin)

sekoitettiin kuivalla YT-agarmaljalla, ja inkuboitiin 12 -  
16 tuntia lämpötilassa 28 °C. Bakteerit suspendoitiin ta-  
kaisin 3 ml:aan 10 mM MgSO<sub>4</sub>-liuosta, ja siirrostettiin an-  
tibioottimaljoille (0,05 g/l erytromysiiniä ja 0,025 g/l  
5 kloramifenikolia; valikointi agrobakteerikannan suhteen;  
0,3 g/l streptomysiiniä ja 0,1 g/l spektinomysiiniä, vali-  
kointi pMK110:n Ti-plasmidiin integroitumisen suhteen).  
Näillä selektiivisillä maljoilla pystyvät kasvamaan vain  
ne agrobakteerit, joissa pMPK110-johdannainen on integroi-  
10 tuneena bakteerin Ti-plasmidiin homologisen rekombinaation  
kautta.

Ti-plasmidi pGV3850kanR sisälsi nyt jo aiemmin  
läsnä olleen kasveissa vaikuttavan kanamysiiniantibiootti-  
resistenssigeenin lisäksi myös PTC-resistenssigeenin. En-  
15 nen näiden agrobakteerikloonien käyttöä transformointiin  
varmistettiin "Southern Blot" -kokeella, että haluttu in-  
tegroituminen oli tapahtunut.

b) Binaarinen vektori -menetelmä

Käytettiin binaarista vektorijärjestelmää, jota  
20 ovat kuvanneet Koncz et al. [Mol. Gen. Genet. 204 (1986)  
383]. Konczin et al. [PNAS 84 (1987) 131] kuvaamaa vekto-  
ria pPCV701 muutettiin seuraavasti: Vektorista poistettiin  
restriktioentsyymeillä BamHI ja HindIII fragmentti, jossa  
sijaitsevat mm. promoottorit TR1 ja TR2. Tuloksena oleva  
25 plasmidi suljettiin takaisin renkaaksi. Tässä vektorissa  
olevaan EcoRI-pilkkoutumiskohtaan insertoitiin noin 800  
emäsparin pituinen, vektorista pDH51 saatu fragmentti, jo-  
ka sisälsi kukkakaalinmosaiikkiviruksen 35S-transskriptin  
promoottorin ja terminaattorin [Pietrzak et al., Nucleic  
30 Acids Res. 14 (1986) 5858]. Tuloksena olevassa plasmidissa  
pPCV801 oli 35S-promoottorin ja -terminaattorin välissä  
yhden kerran esiintyvä SalI-pilkkoutumiskohta. Optimoitu  
PTC-resistenssigeeni insertoitiin tähän pilkkoutumiskoh-  
taan. Sen ilmentyminen oli nyt 35S-transskriptin sääte-  
35 lysekvenssien ohjauksessa.

Tällä plasmidilla (pPCV80aAc) transformoitiin *E. coli* -kanta SM10 [Simon et al., *Bio/Technology* 1 (1983) 784]. Plasmidin pPCV801Ac siirtämiseksi *Agrobacterium tumefaciens*iin sekoitettiin 50 µl SM10-viljelmää ja 50 µl C58-agrobakteeriviljelmää [GV101, Van Larebeke et al., *Nature* 252 (1974) 169] apuplasmidina käytetyn Ti-plasmidin pMP90RK (Koncz et al., *Mol. Gen. Genet.* 204 (1986) 383) kanssa kuivalla YT-agarmaljalla, ja inkuboitiin noin 15 tuntia lämpötilassa 28 °C. Sen jälkeen bakteerit suspensoitiin takaisin 1 mM MgSO<sub>4</sub>-liuokseen (3 ml) ja siirrotettiin antibioottimaljoille (0,1 g/l rifampisiinia, valikointi GV3101:n suhteen; 0,025 g/l kanamysiiniä, valikointi pMP90RK:n suhteen; 0,1 g/l karbenisilliinia, valikointi nPCV801ac:n suhteen). Näillä maljoilla pystyivät kasvamaan vain ne agrobakteerit, jotka sisältävät molemmat plasmidit (pMP90RK ja pPCV(01Ac). Ennen näiden agrobakteerien käyttöä kasvien transformointiin varmistettiin "Southern Blotting" -menetelmällä, että plasmidi pPCV801Ac esiintyy oikeassa muodossaan agrobakteereissa.

#### 20           8. *Nicotiana tabacum*in transformointi *Agrobacterium tumefaciens*illa

Optimoitu resistenssigeeni siirrettiin niin kutsutulla "leaf disc" -transformointimenetelmällä tupakkakasveihin.

25           Agrobakteereja kasvatettiin 30 ml:ssa LB-alustaa, joka sisälsi vastaavia antibiootteja, lämpötilassa 28 °C jatkuvasti ravistellen (noin 5 vrk). Sitten bakteerit sedimentoitiin sentrifugoimalla 10 min kierrosnopeudella 7000 min<sup>-1</sup> Christ-sentrifugissa ja pestiin kerran 20 ml:lla 10 mM MgSO<sub>4</sub>-liuosta. Lisäsentrifugoinnin jälkeen bakteerit suspensoitiin 20 ml:aan 10 mM MgSO<sub>4</sub>-liuosta ja siirrettiin petrimaljaan. Lehdenpalojen infektointiin käytettiin steriiliviljelmänä 2MS-alustassa kasvavan Wisconsin 38 -tupakkakasvinlehtiä. Kaikkia steriiliviljelmiä pidettiin lämpötilassa 25 - 27 °C valaistusrytmin ollessa 16 tuntia valkoisessa valossa/8 tuntia pimeässä.

Tupakan lehdet leikattiin, ja hiottiin lehtien pinnat hiekkapaperilla. Hionnan jälkeen lehdet leikattiin pienemmiksi paloiksi, jotka kasteltiin bakteeriviljelmässä. Sitten lehdenpalat siirrettiin M + S -alustalle ja  
5 niitä pidettiin 2 vrk normaaleissa kasvatusolosuhteissa. Kun oli tehty 2 vrk kestävä infektointi bakteereilla, kasvatettiin lehdenpaloja nestemäisessä M + S -alustassa ja siirrettiin ne sitten MSC10-agarmaljoille. Transformoituneet versot valikoitiin kanamysiiniresistenssin perusteella.  
10 la. Ensimmäiset versot olivat havaittavissa 3 - 6 viikon kuluttua. Yksittäisiä versoja kasvatettiin edelleen lasitölkeissä MSC15-alustassa. Seuraavien viikkojen aikana muodostui joidenkin irtileikattujen versojen leikkauskohtiin juuria.

15 Transformoidut kasvit voitiin valikoida myös suoraan PTC-pitoisilla kasvien kasvatusalustoilla. Transformoitujen kasvien DNA-analyysillä ("Southern Blotting") ja RNA-analyysillä ("Northern Blotting") osoitettiin PTC-resistenssigeenin läsnäolo ja ilmentyminen.

## 20 9. Transformoitujen kasvien PTC-resistenssin osoittaminen

Transformoiduissa kasveissa olevan resistenssigeenin toimivuuden osoittamiseksi siirrettiin transformoitujen ja transformoimattomien kasvien lehdenpaloja M + S  
25 -alustalle, joka sisälsi  $1 \times 10^{-4}$  mol/l L-PTC:tä. Transformoimattomien kasvien osat kuolivat, kun taas transformoituneiden kasvien osista voitiin saada uusia versoja. Transformoidut versot juurtuivat ja kasvoivat ongelmattomasti M + S -alustoilla, jotka sisälsivät  $1 \times 10^{-3}$  mol/l  
30 L-PTC:tä. Transformoidut kasvit istutettiin steriilistä olosuhteista maahan, ja tehtiin PTC-ruiskutus (2 ja 5 kg/ha). Transformoimattomat kasvit eivät kestäneet tätä herbisidikäsittelyä, kun taas transformoiduissa kasveissa ei esiintynyt herbisidin aiheuttamia vaurioita. Ruiskutet-  
35 tujen transformoitujen kasvien ulkonäkö ja kasvukäyttäyty-



MET SER PRO GLU ARG ARG PRO VAL GLU ILE ARG PRO ALA THR ALA ALA ASP MET ALA VAL CYS ASP ILE VAL ASN HIS TYR  
 TC GAC ATG TCT CCG GAG AGG AGA CCA GTT GAG ATT AGG CCA GCT ACA GCA GCT GAT ATG GCC GCG GTT TGT GAT ATC GTT AAC CAT TAC  
 G TAC AGA GGC CTC TCC TCT TCC TAA TCC GGT CGA TGT CGT CGA CTA TAC CGG CGC CAA ACA CTA TAG CAA TTG GTA ATG

4

ILE GLU THR SER THR VAL ASN PHE ARG THR GLU PRO GLN THR PRO GLN GLU TRP ILE ASP ASP LEU GLU ARG LEU GLN ASP ARG TYR PRO  
 ATT GAG ACG TCT ACA GTG AAC TTT AGG ACA GAG CCA CAA ACA CCA CAA GAG TGG ATT GAT CTA GAG AGG TTG CAA GAT AGA TAC CCT  
 TAA CTC TGC AGA TGT CAC TTG AAA TCC TGT CTC GGT GTT TGT GGT GGT GTC ACC TAA CTA CTA GAT CTC TCC AAC GTT CTA TCT ATG GGA

100

TRP LEU VAL ALA GLU VAL GLU GLY VAL VAL ALA GLY ILE ALA TYR ALA TYR ALA ARG ASN ALA TYR ASP TRP THR VAL VAL GLU  
 TGG TTG GTT GCT GAG GTT GAG GGT GTT GTG GCT GGT ATT GCT TAC GCT GAG GCT AGG AAC GCT TAC GAT TGG ACA GTT GAG  
 ACC AAC CAA CGA CTC CAA CTC CCA CCA CAA CAC CGA CCA TAA CGA ATG CGA CCC GGG ACC TTC CGA TCC TTG CGA ATG CTA ACC TGT CAA CTC

200

SER THR VAL TYR VAL SER HIS ARG HIS GLN ARG LEU GLY LEU GLY SER THR LEU TYR THR HIS LEU LEU LYS SER MET GLU ALA GLN GLY  
 AGT ACT GTT TAC GTG TCA CAT AGG CAT CAA AGG TTG GGC CTA GGA TCC ACA TTG TAC ACA CAT TTG CTT AAG TCT ATG GAG CCG CAA GGT  
 TCA TGA CAA ATG CAC AGT GTA TCC TCC GAT CCA GAT CCA TAA CGA ATG CCA GCG CCC GGG ACC TTC GTA AAC GAA TTC AGA TAC CTC CGC GTT CCA

300

PHE LYS SER VAL VAL ALA VAL ILE GLY LEU PRO ASN ASP PRO SER VAL ARG LEU HIS GLU ALA LEU GLY TYR THR ALA ARG GLY THR LEU  
 TTT AAG TCT GTG GTT GCT GAT ATA GGC CTT CCA AAC GAT CCA TCT GTT AGG TTG CAT GAG GCT TTG GGA TAC ACA GCC CGG GGT ACA TTG  
 AAA TTC AGA CAC CAA CGA CAA TAT CCG GAA GGT TTG CTA GGT AGA CAA TCC AAC GTA CTC CGA AAC CCT ATG TGT CGG GCC CCA TGT AAC

400

ARG ALA ALA GLY TYR LYS HIS GLY HIS GLY TRP TRP PHE THR GLN ARG ASP PHE GLU LEU PRO ALA PRO PRO ARG PRO VAL ARG  
 CGC GCA GCT GGA TAC AAG CAT GGT GGA TGG CAT GAT GGT TTT TGG CAA AGG GAT TTT GAG TTG CCA GCT CCT CCA AGG CCA GTT AGG  
 GCG CGT CGA CCT ATG TTC GTA CCA CCT ACC GTA CAA CCA AAA ACC GTT TCC CTA AAA CTC AAC GGT CGA GGA GGT TCC GGT CAA TCC

500

PRO VAL THR GLN ILE ---  
 CCA GTT ACC CAG ATC TGA G  
 GGT CAA TGG GTC TAG ACT CAG CT

Aminohappo- ja DNA-sekvenssi I

MET SER PRO GLU ARG ARG PRO VAL GLU ILE ARG PRO ALA THR ALA ALA ASP MET ALA VAL VAL CYS ASP ILE VAL ASN HIS TYR  
 TC GAC ATG TCT CCG GAG AGG AGA CCA GGT GAG ATT AGG CCA GCT ACA GCA GCT GAT ATG GCG GGT TGT GAT ATC GTT AAC CAT TAC  
 G TAC AGA GGC CTC TCC TCT GGT CAA CTC TAA TCC GGT CGA TGT CGT CGA CTA TAC TAC GCG CGC CAA ACA CTA TAG CAA TTG GTA ATG

ILE GLU THR SER THR VAL ASN PHE ARG THR GLN PRO GLN THR PRO GLN GLU TRP ILE ASP ASP LEU GLU ARG LEU GLN ASP ILE VAL ASN HIS TYR PRO  
 ATT GAG ACG TCT ACA GTG AAC TTT AGG ACA GAG CCA ACA ACA GAG TGG ATT GAT GAT CTA GAT CTA GAG AGG TTG CAA GAT AGA TAC CCT  
 TAA CTC TGC AGA TGT CAC TTG AAA TCC TGT GGT GGT GGT CTC ACC TAA CTA CTA GAT CTC TCC AAC GTT CTA TCT ATG GGA

TRP LEU VAL ALA GLU VAL GLU GLY VAL VAL GLN ARG HIS GLN ARG LEU GLY SER THR LEU TYR THR HIS LEU LEU LYS SER MET GLU ALA GLN GLU  
 TGG TTG GTT GCT GAG GTT GAG GGT GTT GTG GCT GGT ATT GCT TAC GCT GCA TCC ACA TTT TAC ACA TTT AAG TCT ATG GAG GCG CAA GAT GAG  
 ACC AAC CAA CGA CTC CAA CTC CCA CCA CCA CCA TAA CGA ATG CGA CCC CGC ACC TTC CGA TCC TTG CGA ATG CTA ACC TGT CAA CTC

SER THR VAL TYR VAL SER HIS ARG HIS ARG LEU GLY SER THR LEU TYR THR HIS LEU LEU LYS SER MET GLU ALA GLN GLU  
 AGT ACT GTT TAC GTG TCA CAT AGG CAT CAA AGG TTG GGC CTA GCA TCC ACA TTT TAC ACA CAT TTG CTT AAG TCT ATG GAG GCG CAA GAT  
 TCA TGA CAA ATG CAC AGT GTA TCC GTA TCC CCA GAT CCT AGG TGT AAC ATG TGT GTA AAC GAA TTC AGA TAC TAC CTC CGC GTT CCA

PHE LYS SER VAL VAL ALA VAL ILE GLY LEU PRO ASN ASP PRO SER VAL ARG LEU HIS GLU ALA LEU GLY TYR THR ALA ARG GLY THR LEU  
 TTT AAG TCT GTG GTT GCT GAT ATA GGC CTT CCA AAC GAT CCA TCT GTT AGG TTT CAT GAG GCT TTG GGA TAC ACA GCC CGG GGT ACA TTG  
 AAA TTC AGA CAC CAA CGA CAA TAT CCG GAA GGT TTG CTA GGT AGA CAA TCC AAC GTA CTC CGA AAC CCT ATG TGT CGG GGC CCA TGT AAC

ARG ALA ALA GLY TYR LYS HIS GLY GLY TRP TRP PHE THR TRP GLN ARG ASP PHE GLU LEU PRO ALA PRO PRO ARG PRO VAL ARG  
 CCG CCA GCT GGA TAC AAG CAT GGT GGA CCT ACC GTA CCA CCT ACC GGT TTT TGG CAA AGG GAT TTT GAG TTG CCA CCT CCT CCA AGG CCA GTT AGG  
 GCG CGT CGA CCT ATG TTC GTA CCA CCT ACC GTA CCA CCA AAA ACC GTT TCC CTA AAA CTC AAC GGT CGA GGT TCC GGT CAA TCC

IVa  
 PRO VAL THR GLN ILE ---  
 CCA GTT ACC CAG ATC TGA G  
 GGT CAA TGG GTC TAG ACT CAG CT

Aminohappo- ja DNA-sekvenssi II



**Patenttivaatimukset**

1. Aminohapposekvenssin I (liite, s. 15) mukaista proteiinia koodittava resistenssigeeni, t u n n e t t u  
5 siitä, että aloituskodonina käytetään ATG ja lopetus-  
kodonina TGA, ja että geenin GC-pitoisuus on mukautettu  
kasveihin sopivaksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen resistenssigeeni, t u n n e t t u siitä, että sillä on DNA-sekvenssi I  
10 (liite, s. 15 nukleotidit 9 - 554).

3. Geenirakenne, t u n n e t t u siitä, että  
siinä on DNA-sekvenssi I (liite, s. 15) kytkettynä kas-  
veissa toimiviin säätely- ja ilmentymissignaaleihin.

4. Vektori, t u n n e t t u siitä, että siinä on  
15 patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen resistenssigeeni.

5. Vektori, t u n n e t t u siitä, että siinä on  
patenttivaatimuksen 3 mukainen geenirakenne.

6. Vektoreita, t u n n e t t u siitä, että niissä  
on yksi tai useampia geenifragmenteista I - IV (liite, s.  
20 16).

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen geenin tai  
patenttivaatimuksen 3 mukaisen geenirakenteen käyttö, fos-  
finotrisiiniresistenttien kasvisolujen, kasvinosien, kas-  
vien, ja siemenien aikaansaantiin.

**Patentkrav**

1. Resistensgen som kodar för proteinet med aminosyrasekvensen I (bilagan s. 15), kännetecknad av  
5 att man som startkodon använder ATG och som stoppkodon TGA, och att GC-halten hos genen är anpassad till den i växter.
2. Resistensgen enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den har DNA-sekvensen I (bilagan s. 15  
10 nukleotiderna 9 - 554).
3. Genstruktur, kännetecknad av att den innefattar DNA-sekvensen I (bilagan s. 15) kopplad till i växter verksamma reglerings- och uttryckningssignaler.
4. Vektor, kännetecknad av att den innefattar resistensgen enligt patentkrav 1 eller 2.  
15
5. Vektor, kännetecknad av att den innefattar en genstruktur enligt patentkrav 3.
6. Vektorer, kännetecknade av att de innefattar en eller flera av genfragmenten I - IV (bilagan s.  
20 16).
7. Användning av en gen enligt patentkrav 1 eller 2, eller av en genkonstruktionen enligt patentkrav 3 för att alstra fosfinotricin-resistenta växtceller, växtdelar, växter och frön.