

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 916117 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **916117**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/82

C12N 15/60

C12N 15/29

C12N 15/01

C12N 5/10

C12N 9/88

A01H 4/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **23.12.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.12.1991**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **28.06.1992**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoiikeus - Prioritet - Priority

27.12.1990 US 633210

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • American Cyanamid Company, One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470-8426, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Hand, John Mark, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Singh, Bijay Kumar, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Chaleff, Roy Scott, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Herbisidiresistenttejä AHAS-deleetiomutanteja

Herbisidiresistentia AHAS-deletionsmutanter

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

68488 ATCC

68489 ATCC

Herbisidiresistenttejä AHAS-deleetiomutantteja

Tämä keksintö koskee uusia DNA-sekvenssejä, jotka koodaavat asetohydroksihapposyntaasi-entsyymien (jäljempänä AHAS) uusia poikkeavia muotoja. AHAS-entsyymi on kriittinen entsyymi, jota normaalisti valmistuu monissa eri kasveissa ja laajassa valikoimassa mikro-organismeja. Normaalien AHAS:in toimintaa inhiboivat monet erilaiset herbisidityypit; kuitenkin kyseisten mutantti-DNA-sekvenssien koodaamat uudet AHAS-entsyymit toimivat normaalisti katalyyttisesti myös tällaisten herbisidien läsnä ollessa ja antavat siis herbisidiresistenssin niitä sisältävälle kasville tai mikro-organismille.

Uudet DNA-sekvenssit perustuvat yllättävään havaintoon, että yhden tai useamman spesifisen aminohapon deleetio normaalin AHAS-geenisekvenssin eräillä alueilla johtaa täysin funktionaaliseen entsyymiin, mutta tekee entsyymien vastustuskykyiseksi monien erilaisten herbisidityyppien, mukaan lukien imidatsolinoneja, triatsolopyrimidiinejä ja sulfonyyliureoita, aiheuttamalle inhibitiolle. Näiden poikkeavien sekvenssien käytettävissäolo tarjoaa keinon monien erilaisten viljelykasvien transformoimiseksi herbisidiresistenteiksi sekä tarjoaa myös uusia selektoitavia merkkigeenejä käytettäväksi muun tyyppisissä geneettisen transformaation kokeissa.

Keksinnön taustaa

Herbisidien käyttö maanviljelyksessä on nykyään laajalle levinnyttä. Vaikka saatavana on suuri joukko yhdisteitä, jotka tuhoavat tehokkaasti rikkaruohoja, kaikki herbisidit eivät kykene selektiivisesti vaikuttamaan epäsuotaviin kasveihin viljelykasvien joukossa eivätkä myöskään olemaan myrkyttömiä eläimille. Usein on välttämätöntä tyytyä yhdisteisiin, jotka ovat yksinkertaisesti vähemmän myrkyllisiä viljelykasveille kuin rikkaruohoille. Tämän ongelman voittamiseksi herbisidiresistenttien viljelykas-

vien kehittamisestä on tullut tärkeä maanviljelystutkimuksen kohde.

Tärkeä puoli herbisidiresistenssin kehittämisessä on ymmärtää, miten herbisidi toimii estäessään kasvin kasvua, ja sitten manipuloida vaikutuksen kohteena olevaa biokemiallista reittiä viljelykasvissa, niin että estävä vaikutus vältetään, mutta kasvi säilyttää normaalin biologisen toiminnan. Yksi ensimmäisistä herbisidien biokemiallisista mekanismeista koskevasta löydöistä koski sarjaa rakenteeltaan yhteen kuulumattomia herbisidiyhdisteitä, imidatsolinoneja, sulfonyyliureoita ja triatsolopyrimidiinejä. Nyt tiedetään [Shaner et al., Plant Physiol. 76 (1984) 545 - 546, US-patentti 4 761 373], että kukin näistä herbisideistä estää kasvin kasvua häiritsemällä olennaista solun entsyymiä asetohydroksihapposyntaasia (AHAS; sitä nimitetään myös asetolaktaattisyntaasiksi eli ALS:ksi). AHAS vaaditaan aminohappojen isoleusiini, leusiini ja valiini synteesiä varten.

AHAS-entsyymiä tiedetään olevan läsnä kaikkialla korkeampien kasvien keskuudessa sekä löytyvän monista eri mikro-organismeista kuten hiivasta *Saccharomyces cerevisiae* ja suolibakteereista *Escherichia coli* ja *Salmonella typhimurium*. Normaalin AHAS-entsyymin tuottamisen geneettinen perusta monissa näistä lajeista on myös karakterisoitu hyvin. Esimerkiksi sekä *E. coli*ssa että *S. typhimurium*issa esiintyy kolme AHAS-isotsyymiä; kaksi näistä on herkkiä herbisideille, kun taas kolmas ei ole. Kukin näistä isotsyymeistä omaa yhden suuren ja yhden pienen proteiinialayksikön; ja ne sijoittuvat kartassa *IlvIH*-, *IlvGM*- ja *IlvBN*-operoneihin. Hiivassa ainoan AHAS-isotsyymin on kartoitettu sijaitsevan *ILV2*-lokuksessa. Kussakin tapauksessa on identifioitu herkkiä ja resistenttejä muotoja ja eri alleelien sekvenssit on määritetty [Friden et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985) 3979 - 3993; Lawther et al., PNAS USA 78 (1982) 922 - 928; Squires et al.,

Nucl. Acids Res. 811 (1983) 5299 - 5313; Wek et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4011 - 4027; Falco ja Dumas, Genetics 109 (1985) 21 - 35; Falco et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4011 - 4027].

5 Tupakassa AHAS-toiminnon koodaa kaksi yhteenkytkey-
tymätöntä geeniä SuRA ja SuRB. Kyseisten kahden geenin
välillä on huomattavaa samaisuutta, sekä nukleotiditasol-
la että aminohappotasolla kypsässä proteiinissa, vaikka
N-terminaalinen, oletettu kuljetusalue eroaa merkittävä-
10 min [Lee et al., EMBO J. 7 (1988) 1241 - 1248]. Lajissa
Arabidopsis on toisaalta yksi ainoa AHAS-geeni, joka on
myös täydellisesti sekvenssoitu. Korkeammassa kasveissa
olevien AHAS-geenien sekvenssien väliset vertailut osoit-
tavat sekvenssin eräiden alueiden korkeaa säilyttämistä-
15 soa; erityisesti on vähintään 10 sekvenssin säilyttämis-
aluetta. On aikaisemmin otaksuttu, että nämä säilytetyt
alueet ovat kriittisiä entsyymin toiminnalle ja että tuon
toiminnan säilyttäminen on riippuvaista olennaisesta sek-
venssin säilyttämisestä.

20 Hiljattain on selostettu (EP 0 257 993), että her-
bisidiresistenssiä osoittavat mutantit omaavat mutaatioita
vähintään yhden aminohapon kohdalla yhdellä tai useammalla
näistä säilytetyistä alueista. Erityisesti villityypin
aminohapon korvaaminen eräillä aminohapoilla näissä spesi-
25 fisissä kohdissa AHAS-sekvenssissä on osoittautunut sie-
dyksi ja itse asiassa johtavan tämän mutaation omaavan
kasvin herbisidiresistenssiin, samalla kun katalyyttinen
toiminta on säilynyt. Näitä mutaatioita on osoitettu
esiintyvän sekä SuRA- että SuRB-lokuksessa tupakassa; sa-
30 mankaltaisia mutaatioita on eristetty lajilta Arabidopsis
ja hiivalta.

Nyt on yllättäen havaittu, että yhden tai useamman
aminohapon deleetiot yhdellä tai useammalla näistä "säily-
tetyistä" alueista eivät ainoastaan johda funktionaaliseen
35 AHAS-entsyymiin, vaan johtavat myös herbisidiresistens-

siin. Sekvenssin säilyttäminen merkitsee normaalisti, että mitään muutosta näillä alueilla ei siedettäisi ja sellainen johtaisi sen vuoksi toimimattomaan proteiiniin. Kuitenkin tässä tapauksessa on erityisen yllättävää, että entsyymin toiminta säilyy, ottaen huomioon se seikka, että deletiot eivät ainoastaan poista aminohappojäännöstä, joka on entsyymin rakenteen komponentti, vaan myös välttämättä johtavat jäännösten siirtymiseen, tuhoten siten mutaation sisältävän sekvenssin näennäisen säilymisen. Näin ollen tarjotaan uusia nukleiinihapposekvenssejä, jotka ovat hyödyllisiä herbisideille herkkien kasvien transformoisessa herbisidiresistentteiksi. Transformoidut kasvit tarjoavat sen vuoksi perustan uusien herbisidiresistenttien kasvimuunnosten kehittämiseksi.

15 **Keksinnön tiivistelmä**

Tämä keksintö tarjoaa uusia nukleiinihapposekvenssejä, jotka koodaavat toimivia, monille eri herbisideille epäherkkiä AHAS-entsyymejä. Kysymyksessä olevat sekvenssit sisältävät yhden tai useamman kodonin, jotka kukin koodaavat spesifisen aminohapon, delettion yhdellä tai useammalla osoitetulla niin kutsutulla säilytetyllä alueella vililytysyppi-AHAS-molekyylissä. Näiden paikkojen identtisyystä ja poistettavia kodoneita tarkastellaan jäljempänä yksityiskohtaisemmin. Muutetut DNA-sekvenssit ovat hyödyllisiä menetelmissä herbisidiresistenttien kasvisolujen tuottamiseksi, jotka mainitut menetelmät käsittävät kohdekasvisolun transformoinnin yhdellä tai useammalla tässä tarjotusta muutetuista sekvensseistä. Vaihtoehtoisesti käytetään mutageneesiä delettiomutanttien aikaansaamiseksi kasvisoluihin tai siemeniin, jotka sisältävät herbisideille herkän AHAS:in koodaavan nukleiinihapposekvenssin. Tällaisille kasvisoluille suoritetaan sitten kudosviljelyä sellaisten kasvien regeneroimiseksi, jotka omaavat herbisidiresistentin tai herbisideille epäherkän piirteen. Keksintö käsittää siten myös kasvisoluja, kasvikudosviljel-

miä, täysikasvuisia kasveja ja kasvinsiemeniä, jotka omaavat deleetiomutanttinukleiinihapposekvenssejä ja jotka ilmentävät funktionaalisia, herbisidiresistenttejä AHAS-entsyymejä.

5 Näiden uusien herbisidiresistenttien kasvien saata-
vuus mahdollistaa uusia menetelmiä viljelykasvien kasvat-
tamiseksi herbisidien läsnä ollessa. Sen sijaan että kas-
vatettaisiin ei-resistenttejä kasveja, pelloille voidaan
10 istuttaa tämän keksinnön mukaisia resistenttejä kasveja ja
peltoa käsitellä tavanomaisesti herbisidillä, ilman että
viljelykasveille aiheutuu vahinkoa. Edullisia herbisidejä
tätä tarkoitusta varten ovat imidatsolinonit, sulfonyyli-
ureat ja triatsolopyrimidiinit.

Tämän keksinnön mukaiset mutanttinukleiinihapot
15 tarjoavat myös uusia selektoitavia merkkigeenejä käytettä-
viksi transformaatiokokeissa. Resistentin AHAS:in koodaava
nukleiinihapposekvenssi liitetään toiseen geeniin ennen
siirtämistä isäntäsoluun ja koko rakennelma transformoi-
daan isäntään. Oletettuja transformoituja soluja kasvate-
20 taan sitten viljelmässä estävien määrien herbisidiä läsnä
ollessa; eloon jäävät solut ovat onnistuneesti hankkineet
kiinnostuksen kohteena olevan toisen geenin.

Seuraavien määritelmien on tarkoitus päteä koko
patenttijulkaisussa ja patenttihakemuksissa. "Funktionaa-
25 linen" tai "normaali" AHAS-entsyymi on sellainen, joka
kykenee katalysoimaan ensimmäistä vaihetta olennaisten
aminohappojen isoleusiinin, leusiinin ja valiinin syn-
teesireitillä. AHAS:in "säilytetty" sekvenssi tai alue
on sellainen sarja nukleiinihappoja tai aminohappoja
30 AHAS-nukleiinihappo- tai aminohapposekvenssissä, joka on
sama vähintään kahdella lajilla, joilla on AHAS-entsyymi.
"Villityyppi"-AHAS-sekvenssi on sekvenssi, joka on läsnä
määrätyn lajin herbisideille herkässä jäsenessä. "Resis-
tentti" kasvi on sellainen, joka tuottaa normaalia AHAS-
35 entsyymiä ja joka kykenee saavuttamaan kypsyyden, kun sitä

kasvatetaan normaalisti estävien herbisiditasojen läsnä ollessa. Termin "resistentti" tarkoitetaan tässä käytettynä käsittävän myös "sietokykyiset kasvit", s.o. sellaiset kasvit, jotka fenotyypissään osoittavat epätoivottavia muttei tappavia reaktioita herbisidin johdosta.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuviot 1a ja 1b (sekvenssiluettelit 1 ja 2) esittävät vastaavasti Arabidopsis-villityyppi-AHAS:in aminohappo- ja nukleotidisekvenssin. Kuviossa 1a laatikossa olevat alueet osoittavat esikuvallisia osasekvenssejä, joissa voidaan tehdä deletioita herbisidiresistenssin tuottamiseksi. Rengastetut jäännökset identifioivat spesifisiä kohtia, joissa tällaisia deletioita voidaan tehdä. Kuviossa 1b nuoli osoittaa koodaavan alueen alkukohdan.

Kuvio 2 (a - c) esittää kolmea valokuvaa jälkeläisistä (ensimmäinen sukupolvi), jotka on saatu tulokseksi transgeenisestä tupakkakasvista (10-1), joka on transformatu Arabidopsis-AHAS:in Trp574-deleetiomutaation sisältävällä rakennelmalla, ja joita on suihkutettu emergenssin jälkeen Pursuit^R-imidatsolinonierbisidillä käyttäen määriä 0, 10, 20, 40, 60, 80 ja 160 grammaa/hehtaari (g/ha). Kaikki kolme valokuvaa otettiin 25 päivää suihkuttamisen jälkeen. Kaikissa valokuvissa kontrollikasvit (villityyppejä oleva herbisideille herkkä tupakka-alalaji Wisconsin 38 [W38]) ovat eturivissä.

a) W38-kontrolli ja 10-1 itse - W38 edustaa kontrollia ja 10-1 itsesiitettyjä transgeenisen tupakan jälkeläisiä. Tapauksessa 0 g/ha Pursuit^R W38 ja 10-1 näyttävät kummatkin samanlaisilta. Määrällä 10 g/ha W38-kasvin kasvu on lievästi estynyt verrattuna 10-1:een: kuitenkin määräästä 20 g/ha lähtien W38:n kasvu on melkein täysin estynyt. Määrällä 80 g/ha 10-1-kasvin kasvu näyttää olevan lievästi estynyt ja määrällä 160 g/ha 10-1-kasvin kasvu on selvästi estynyt.

b) W38-kontrolli ja 0 x 10-1 - W38 on kuten aikai-
semmin kuvattu. 0 x 10-1 edustaa W38:a äitivanhempana (0)
ja 10-1:tä isävanhempana. Tulokset ovat hyvin samankal-
taiset kuin ne, jotka nähdään 10-1:n itsesiitettyjen valo-
kuvassa.

c) W38-kontrolli ja 10-1 x 0 - W38 on kuten aikai-
semmin kuvattu. 10-1 x 0 edustaa 10-1:tä äitivanhempana ja
W38:a isävanhempana (0). Tulokset ovat hyvin samankal-
taiset kuin ne, jotka nähdään 10-1:n itsesiitettyjen valoku-
vassa, paitsi että tässä valokuvassa herbisidiresistenssi-
piirteen segregatio voidaan nähdä 10-1:n jälkeläisissä.

Kuvio 3 valaisee emergenssin jälkeläisen Pursuit^R:n
käytön vaikutusta tupakkataimien kasvuun, mitattuna kas-
vien korkeuden avulla.

C* edustaa kontrolli (herkkä vanhemmaisalalaji)
-kasvien keskiarvoa, kun taas kukin seuraava pylväs edus-
taa yksittäistä transgeenistä jälkeläistä.

Kuvio 4 valaisee imidatsolinoniherbisidin Pursuit^R
vaikutusta AHAS-entsyymeihin, jotka on saatu E. colista,
joka on transformoitu Trp574-deleetiolla [DEL], Trp574-
substituutiolla [SUB], ja E. colista, joka on transformoi-
tu villityyppi [WT] -AHAS-sekvenssillä.

Kuvio 5 valaisee sulfonyyliureaaherbisidin Glean^R
vaikutusta AHAS-entsyymeihin, jotka on eristetty E. coli-
transformanteista. Lyhennykset kuten kuviossa 4.

Kuvio 6 valaisee imidatsolinoniherbisidin Pursuit^R
vaikutusta AHAS-entsyymeihin, jotka on eristetty E. coli-
transformanteista. Entsyymit ovat peräisin E. colista,
joka on transformoitu Ser653-deleetiolla [DEL], E. colis-
ta, joka on transformoitu Ser653-substituutiolla [SUB],
ja E. colista, joka on transformoitu villityyppi [WT]
-AHAS-sekvenssillä.

Kuvio 7 valaisee sulfonyyliureaaherbisidin Glean^R
vaikutusta AHAS-entsyymeihin, jotka on eristetty E. coli-
transformanteista. Lyhennykset kuten kuviossa 6.

Kuvio 8 valaisee imidatsolinoniherbisidin Pursuit^R vaikutusta AHAS-entsyymiin, joka on saatu tupakkakasvista sellaisen *Agrobacterium*-kannan avulla, joka sisältää Trp574-deleetion omaavan mutantti-*Arabidopsis*-AHAS-alleen.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Monissa organismeissa, mukaan lukien hiiva, *E. coli*, *Brassica*, *Arabidopsis*, sokerijuurikas ja tupakka, olevan AHAS-geenin koko nukleotidisekvenssi on aikaisemmin paljastettu [Mazur et al., supra. Lee et al., EMBO J. 7 (1988) 1241]. Lisäksi on pantu merkille, että herbisidiresistenssi liittyy yhteen tai useampaan mutaatioon AHAS-sekvenssissä: erityisesti resistenssin on havaittu liittyvän eräisiin spesifisiin aminohappojen korvaamisiin sekvenssissä. [EP 259 793; Yadav et al., PNAS USA 83 (1986) 4418 - 4422; Sathasivan et al., Nucl. Acids Res. 18 (1990) 2188]. On kuitenkin annettu ymmärtää (Hartnett et al., teoksessa *Managing Resistance to Agrichemicals*, kappale 31, s. 459 - 473, American Chemical Society, 1990; EP 259 793), että nämä säilytetyt alueet, joilla resistenssin antavat mutaatiot esiintyvät, täytyy yleensä säilyttää entsymaattisen toiminnan säilyttämiseksi.

Nyt on yllättäen havaittu, että näiden sekvenssien säilyttäminen ei ilmeisesti ole välttämätöntä molekyylin katalyyttiselle toiminnalle. Tämän keksinnön kehittämisen aikana käytetään *Arabidopsis*-AHAS:in koodaavan alueen kohdennettua mutageneesia sellaisten deleetiomutaatioiden aikaansaamiseksi, joissa jäännös, jonka on aikaisemmin osoitettu olevan korvattavissa, poistetaan silloin sekvenssistä. Jäännöksen poistaminen selvästi tuhoaa niiden alueiden säilytetyn luonteen, joilla ne esiintyvät. Kuitenkin siten aikaansaadut deleetiomutaatiot säilyttävät kaikki AHAS:in toiminnan, samalla kun ne myös osoittavat herbisidiresistenssiä. Erityisesti tehdään Trp574-, Pro197- ja Ser653-jäännösten yksinäisiä deleetioita ja

Prol97:n ja Ser653:n kaksoisdeleetioita täysin funktionaalisten, herbisidiresistenttien kasvien aikaansaamiseksi. Kaikki aminohappojen numerointi perustuu tässä Arabidopsis-AHAS:in sekvenssiin. Kuitenkin on selvää, että koko

5 patenttijulkaisussa ja patenttivaatimuksissa viittauksen spesifiseen deleetiokohtaan Arabidopsis-sekvenssissä tarkoitetaan käsittävän vastaavat kohdat minkä tahansa muun lajin, jolla on AHAS-geeni, AHAS-sekvenssissä.

Nämä tiedot huomioon ottaen tulee selväksi, että

10 näiden AHAS-molekyylin herbisidiresistenssiin liittyvien alueiden säilyttäminen ei ole katalyyttistä aktiivisuutta varten kriittistä ja että entsyymi sietää helposti yhden tai useamman aminohapon deleetioita yhdessä tai useammassa "säilytetyssä" aminohapposekvenssissä ja ne lisäksi antavat kasville herbisidiresistenssin. Tämä keksintö käsittää

15 AHAS-DNA-sekvenssejä, joissa on tehty yksi tai useampia deleetioita verrattuna villityypin sekvenssiin, jotka deleetiot eivät muuta tuloksena olevan AHAS-entsyymin katalyyttistä toimintaa, mutta jotka antavat herbisidiresistenssin. Tällaisia deleetiomutaatioita ovat, mainittuihin

20 kuitenkin rajoittumatta, yhden tai useamman sellaisen kodonin deleetio, jotka koodaavat EP 257 793:ssa määritellyn mukaisia "säilytettyjä osasekvenssejä". Näitä ovat DNA-sekvenssit, jotka koodaavat aminohappoja 119 - 122,

25 194 - 197, 201 - 208, 255 - 257, 348 - 353, 373 - 377 ja 569 - 578 Arabidopsis-AHA:issa. Lisäksi vielä eräs "säilytetty sekvenssi", jossa korvaamista on kuvattu ja jossa deleetio on hyödyllinen herbisidiresistenssin aikaansaamiseksi, on 650 - 653. Yhden kodonin ja useamman kuin yhden kodonin deleetion kaikkien kodonien deleetioon saakka

30 yllä mainituissa "osasekvensseissä" katsotaan kuuluvan keksinnön piiriin. Edullisia ovat sellaisia mutantteja koodaavat kodonideleetiot, joilla on vähintään yhden sellaisen jäännösaseman deleetio, joka on valittu aminohapon

35 120, 121, 197, 205, 256, 351, 376, 571, 574, 578 ja 653

käsittävästä ryhmästä. Erityisen edullisia ovat sekvenssit, jotka koodaavat deleetioita kohdissa 197, 574 tai 653.

Vaikka yllä identifioidut deleetiot edustavat alueita, joilla muunnos tiedetään siedetyksi, on todennäköistä molekyylin huomattavan "joustavuuden" huomioon ottaen, että myös muut deleetiot olisivat mahdollisia. Esimerkiksi myös muita ilmeisesti "säilytettyjä" AHAS-entsyymin alueita esiintyy yllä pääpiirteittäin esitettyjen lisäksi. Haluamatta sitoutua mihinkään erityiseen teoriaan, näyttää nyt todennäköiseltä, että sen sijaan että olisivat molekyylin katalyyttiseen aktiivisuuteen liittyviä kohtia ja sen vuoksi vaatisivat oleellista rakenteen säilyttämistä, useimmat näistä säilytetyistä alueista edustavat herbisidin sitoutumiskohtia. Yhden tai useamman aminohapon deleetio näistä kohdista estäisi siten loogisesti herbisidin sitoutumista ja siten estäisi herbisidiä häiritsemästä AHAS:in aktiivisuutta. Käyttäen näitä perusteita, saatavissa olevaa "säilytettyjä" AHAS-sekvenssejä koskevaa tietoa [katso esim. Mazur et al., Plant Physiol. 85 (1987) 1110 - 1117] ja tunnettuja tekniikkoja kuten paikkaspesifistä mutageneesiä, olisi rutiininomainen asia suunnitella lisää deleetiomutanteja, joilla todennäköisesti olisi herbisidiresistenssi. Oletettuja mutanteja voidaan sitten seuloa kasvattamalla estävien määrien kiinnostuksen kohteena olevaa herbisidiä läsnä ollessa, jotta saataisiin määritettyä, onko vai ei tuotettu herbisidiresistenssi.

Kuten kaikkien proteiinien tapauksessa funktionaalinen AHAS-entsyymi omaa kolmiulotteisen rakenteen, joka on lopputulos komponenttiaminohappojen lineaarisesta järjestyksestä. Aminohappojen sivuryhmien vuorovaikutus tuottaa proteiinin sekundaarisen rakenteen ja lisälaskostuminen johtaa proteiinin tertiaariseen rakenteeseen. Määrätyn proteiinin spesifinen "arkkitehtuuri", joka pohjimmaltaan johtuu aminohappojärjestyksestä, voi olla kriittinen pro-

5 teiinin toiminnalle. Siten aminohapon korvaaminen säilyt-
 tää proteiinin kokonaisrakenteen eheyden, kun taas amino-
 hapon poistaminen tehokkaasti tuhoaa tämän rakenteen ehey-
 den ja sen voidaan odotta merkittävästi muuttavan proteiini-
 10 nin kolmiulotteista rakennetta ja niin tehdessään muutta-
 van molekyylin toimintaa. Siksi ottaen huomioon mahdol-
 linen vaurio, jonka deletio voi aiheuttaa, on erityisen
 yllättävää, että tuloksena oleva molekyyli säilyttää riit-
 täviä osia kolmiulotteisesta rakenteestaan, niin että se
 15 ei ainoastaan säily katalyyttisesti funktionaalisena, vaan
 myös aiheutuu herbisidiresistenssi.

Alan ammattimiehet käsittävät, että tämän keksinnön
 mukaiset deletiomutantit eivät ole rajoitettuja DNA:n tai
 entsyymien lähteen suhteen. Vaikka tässä kokeellisessa
 20 suunnitelmassa ensisijaisesti käytetään Arabidopsis-AHAS-
 geenin sekvenssiä, samankaltaisia mutaatioita voidaan ru-
 tiininomaisesti tehdä minkä tahansa organismin, jolla on
 tällainen geeni, esim. muiden korkeampien kasvien, hiivan,
 E. coli ja muiden mikro-organismien, AHAS-sekvenssiin.
 25 Villityyppi-AHAS-geenissä todetut samankaltaisuudet kaik-
 kien tunnettujen sekvenssien kesken ovat niin suuret, että
 on rutiinikokeiluasiasa aikaansaada identtisiä mutantteja
 muista AHAS-sekvensseistä kuin Arabidopsis-sekvenssi.
 Vaihtoehtoisesti voidaan rakentaa kimeerisiä geenejä, jot-
 30 ka sisältävät Arabidopsis-AHAS-geenin deletiomutanttiosan
 rekombinoituneena muista lähteistä peräisin olevan AHAS-
 geenin muuttamattomien osien kanssa.

Tässä kuvatut uudet geenityypit voivat antaa resis-
 tenssin yhdelle tai useammalle kuin yhdelle herbisidityy-
 35 pille. Kuten on jo hyvin todistettu, AHAS on useiden eri
 herbisidiluokkien vaikutuskohta, nimittäin imidatsolino-
 nien, sulfonyyliureoiden, triatsolopyrimidiinien, sulfamo-
 yyliureoiden ja sulfonylikarboksamidien. Kuten aminohap-
 pojen korvaamisen antaman herbisidiresistenssin tapaukses-
 35 sa, näiden mutaatioiden antama herbisidiresistenssi voi

olla selektiivinen määrätylle herbisidille tai voi esiintyä ristiresistenssiä useammalle kuin yhdelle herbisidille. Esimerkiksi Trp574:n ja Ser653:n deleetiot aikaansaavat ristiresistenssin sekä imidatsolinoneille että sulfonyyliureoille. Alan ammattimies voi kuitenkin helposti määrittää minkä tahansa erityisen mutantin spesifisyyden seulomalla erikseen esim. pelkkien imidatsolinonien tai pelkkien sulfonyyliureoiden läsnä ollessa ja eristämällä eloon jääneitä kasveja. Ristiresistenssi voidaan määrittää kasvattamalla useamman kuin yhden herbisidiluokan läsnä ollessa. Herbisidityyppejä, joiden yhteydessä tämä keksintö on hyödyllinen, on kuvattu esimerkiksi US-patentissa 4 188 487; 4 201 565; 4 221 586; 4 297 128; 4 554 013; 4 608 079; 4 638 068; 4 647 301; 4 650 514; 4 698 092; 4 701 208; 4 709 036; 4 752 323; 4 772 311 ja 4 798 619; US-patenteissa 4 127 405; 4 435 206; 4 424 703; 4 417 917; 4 398 939; 4 394 506; 4 391 627; 4 383 113; 4 378 991; 4 372 778; 4 371 391; 4 370 480; 4 370 479; 4 369 320 (sulfonyyliureoita).

Nykyään AHAS:in ei ole ainoastaan osoitettu olevan läsnä laajassa joukossa kasveja, vaan sen on myös osoitettu olevan kriittinen kohta, joka määrää herbisidiherkkyyden laajassa valikoimassa oleellisesti toisilleen sukua olemattomia kasveja, esim. maissilla, Brassicalla, tupakalla, pellavalla, Arabidopsiksella ja sokerijuurikkaalla [Stougaard et al., Mol. Gen. Genet. 219 (1989) 413 - 420; Jordan & McHughen, J. Plant Physiol. 131 (1987) 333 - 338; McHughen, Plant Cell Reports 8 (1989) 445 - 449]. Kuten yllä on mainittu, on siten mahdollista tuottaa asiaankuuluva mutaatio suoraan kiinnostuksen kohteena olevaan kasviin tunnettujen mutageneesitekniikkojen avulla. (Katso esimerkiksi Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, ja esimerkki II, infra). Kuitenkin on usein helpompaa aikaansaada transformoituja kasveja sellaisen tunnetun ja eris-

tetyn DNA-sekvenssin avulla, joka sisältää tarpeelliset deleeti-
ot, kuten tässä tapauksessa kuvatut Arabidopsis-
deleetiomutantit. Plasmideja, jotka sisältävät deleetiomu-
tantteja asemissa 574 ja 653, on talletettu kokoelmaan the
5 American Type Culture Collection, Rockville, MD, 6. joulukuuta 1990, vastaavasti talletusnumeroilla ATCC 68488 ja 68489.

Tämän keksinnön mukaiset eristetyt AHAS-DNA-sekvenssit ovat hyödyllisiä kohteena olevien viljelykasvien transformointia varten ja antavat tällöin herbisidiresistenssin, ilman että tarvitaan mutageneesiä. Nykyään on olemassa laaja valikoima tekniikkoja korkeampien kasvien suoran tai epäsuoran transformoinnin ulkopuolelta peräisin olevalla DNA:lla suorittamiseksi, ja mikä tahansa menetelmä, jonka avulla uusi sekvenssi voidaan liittää isännän genomiin ja saada stabiilisti periytymään sen jälkeläisille, on tässä keksinnössä mahdollinen. Yhden sellaisen menetelmän yksityiskohtainen kuvaus tarjotaan seuraavissa esimerkeissä.

Kasvisolujen epäsuora transformointi voidaan suorittaa käyttämällä vektoreita. Yleinen menetelmä transformoinnin suorittamiseksi on Agrobacterium tumefaciensin käyttäminen vieraan geenin viemiseksi kohteena olevaan kasvisoluun. Esimerkiksi kysymyksessä olevassa tapauksessa mutantti-AHAS-sekvenssi liitetään plasmidivektoriin, joka sisältää sivuilla olevat sekvenssit Ti-plasmidi-T-DNA:ssa. Plasmidi transformoidaan sitten E. coliin. Suoritetaan kolmen vanhemman välinen pariutumisen tämän kannan, Agrobacterium-kannan, joka sisältää sellaisen vaarattomaksi tehdyn Ti-plasmidin, joka sisältää AHAS:in sisältävien T-DNA-sekvenssien siirtämiseen kohteena olevan kasvin kromosomiin tarvittavat virulenssifunktiot, ja toisen E. coli -kannan kesken, joka sisältää plasmidin, jossa on AHAS-rakennelman E. colista Agrobacteriumiin siirron mobilisointiin tarvittavat sekvenssit. Rekombinantti-Agrobac-

terium-kannalla, joka sisältää tarpeelliset sekvenssit kasvin transformaatiota varten, infektoidaan lehtikiekkoja. Kiekkoja kasvatetaan selektiokasvualustoilla ja onnistuneesti transformoituja regeneraatteja identifioidaan.

5 Regeneroidut kasvit ovat resistenttejä herbisidin vaikutuksille, kun niitä kasvatetaan sen läsnä ollessa. Muut kasvivektorit kuten kasviviruset tarjoavat myös mahdollisen keinon ulkopuolelta peräisin olevan DNA:n siirtoa varten.

10 Voidaan myös käyttää kasvisolujen suoraa transformointia vektorien käytön asemesta. Tyypillisesti sijoitetaan kohdekasvin protoplasteja viljelemään siirrettävän DNA:n läsnä ollessa ja ainetta, joka edistää DNA:n ottamista protoplastin sisään, absorboidaan niiden pinnalle.

15 Hyödyllisiä aineita tässä suhteessa ovat polyeteeniglykoli tai kalsiumfosfaatti.

Vaihtoehtoisesti DNA:n sisäänottoa voidaan kiihottaa elektroporaation avulla. Tässä menetelmässä käytetään sähkösysäystä tilapäisten huokosten avaamiseksi protoplastin solukalvoon ja ympäröivässä liuoksessa oleva DNA tulee sitten vedetyksi soluun huokosten kautta. Samoin voidaan käyttää mikroinjektiota DNA:n toimittamiseksi suoraan soluun ja edullisesti suoraan solun tumaan.

20

Kussakin edellä olevista tekniikoista transformatio tapahtuu viljelmässä olevassa kasvisolussa. Transformaatiotapahtuman jälkeen kasvisoluja täytyy regeneroida kokonaisiksi kasveiksi. Tekniikkoja kypsien kasvien regeneroimiseksi haavasolukosta tai protoplastiviljelmästä tunnetaan nykyään suurta joukkoa erilaisia lajeja varten

25 (katso esim. Handbook of Plant Cell Culture, vol. 1 - 5, 1983 - 1989 McMillan, N.Y.). Täten kun transformatio on aikaansaatu, kypsien kasvien regenerointi transformoiduista kasvisoluista on alalla tunnettua.

30

Nykyään on myös käytettävissä vaihtoehtoisia menetelmiä, jotka eivät välttämättä vaadi eristettyjen solujen

35

ja sen vuoksi regenerointitekniikkojen käyttöä transformaation aikaansaamiseksi. Näitä nimitetään yleensä "ballistisiksi" tai "hiukkaskiihdytys"-menetelmiksi, joissa DNA:lla päällystettyjä metallihiukkasia ajetaan kasvisolu-
 5 luihin joko mustaruutipanoksen avulla [Klein et al., Nature 327 (1987) 70 - 73] tai sähköpurkauksen avulla (EPO 270 356). Tällä tavoin viljelmässä olevia kasvisoluja tai kasvin lisääntymiselimiä tai -soluja, esim. siitepö-
 10 lyä, voidaan stabiilisti transformoida kiinnostuksen kohteena olevalla DNA-sekvenssillä.

Tätä keksintöä voidaan käyttää käytännöllisesti katsoen minkä tahansa kasvityypin, sekä yksisirkkaisen että kaksisirkkaisen, transformointiin. Viljelykasveja, joille transformointi herbisidiresistentiksi on mahdolli-
 15 nen, ovat maissi, vehnä, riisi, hirssi, kaura, ohra, durra, luserni, sokerijuurikas, Brassica-lajit, tomaatti, pippuri, soijapapu, tupakka, meloni, mantelikuorpitsa, peruna, maapähkinä, herne, puuvilla tai kaakao. Uusia sekvenssejä voidaan myös käyttää koristelajien kuten ruusun
 20 ja puulajien kuten männyn transformointiin.

Keksinnön mukaiset uudet sekvenssit ovat myös hyödyllisiä selektoitavina merkkigeeneinä kasvigenetiikan tutkimuksissa. Esimerkiksi kasvin transformaatiossa herbisidiresistenssin koodaavia sekvenssejä voitaisiin liittää
 25 kiinnostuksen kohteena olevaan geeniin, jota on tarkoitus käyttää kohteena olevan herbisidille herkän kasvisolun transformointiin. Rakennelma, joka sisältää sekä kiinnostuksen kohteena olevan geenin että herbisidiresistenssi-sekvenssin, viedään kasvisoluun ja kasvisoluja kasvatetaan
 30 sitten estävän määrän herbisidiä läsnä ollessa. Tällaisessa käsittelyssä eloon jäävät kasvisolut ovat todennäköisesti hankkineet sekä resistenssigeenin että kiinnostuksen kohteena olevan geenin, ja sen vuoksi oletetut transformantit ovat helposti identifioitavissa.

Keksintöä valaistaan lisäksi seuraavien ei-rajoittavien esimerkkien avulla.

Esimerkki 1

5 Arabidopsis-AHAS:in koodaavan genomikloonin eristäminen

2,1 kiloemäksen EcoRI-fragmentti, joka käsittää Arabidopsis-AHAS:in promoottorin, kuljetuspeptidin ja osan kypsän proteiinin koodaavasta alueesta, merkitään ^{32}P :lla käyttäen lovi (nick) -translaatiota (Maniatis et al.,
 10 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982) ja sitä käytetään hybridisaatiokoettimena sellaisen genomikirjaston seulontaan, joka on valmistettu Arabidopsis thaliana -genomi-DNA:sta (Clontech, Palo Alto, CA). Suodattimia
 15 hybridisoidaan 24 tunnin ajan 42 °C:ssa liuoksessa, jossa on 6 x SSC, 5 x Denhardtin liuos, 50 mM natriumfosfaattia, pH 7,2, 0,1 % SDS ja 100 µg/ml denaturoitua lohen maidin DNA:ta. Suodattimia pestään useita kertoja 60 °C:ssa liuoksessa, jossa on 1 x SSC ja 0,1 % SDS. Kuusi rekombinanttibakteriofaagia (A22, A31, A42, A52, A72, A83) luokiteltiin oletetuiksi positiivisiksi. Nämä bakteriofaagit puhdistetaan plakkipuhdistuksen avulla ja niillä infektoidaan käyttäen alhaista kerrannaisuutta. E. coli -kanta K802 nestemäisessä NZY-liemessä (NZCYM on 10 g NZ-amiinia,
 25 5 g hiivauutetta, 1 g casamino-happoja, 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ja 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,2) kuten ovat kuvanneet Maniatis et al., supra. Nesteviljelmiä inkuboidaan yön ajan jatkuvasti ravistaen (300 kierrosta minuutissa) 37 °C:ssa. 50 ml:n suspensio saatetaan pitoisuuteen 1 M NaCl ja 8 % PEG
 30 lisäämällä kiinteää NaCl ja kiinteää polyeteeniglykolia. Suspensiota inkuboidaan yön ajan 4 °C:ssa bakteriofaagien saostamiseksi. Bakteriofaagit pelletoidaan sentrifugoimalla nopeudella 18 000 x 20 minuutin ajan. Pelletti uudelleensuspendoidaan 2 ml:aan TM-puskuriliuosta (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl_2), sijoitetaan kerrokseksi

CsCl-porrasgradientin päälle (4,8 M CsCl, 4,0 M CsCl ja 3,2 M CsCl) ja sentrifugoidaan nopeudella 50 000 x g 1 tunnin ajan SW60- pyörivä kauha -roottorissa. Faagivyyhyke poistetaan 4,0/3,2 M CsCl -rajapinnalta 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen ja bakteriofaagit liuotetaan lisäämällä 1 tilavuus formamidia ja inkuboimalla huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan. DNA otetaan talteen saattamalla liuos pitoisuuteen 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, ja 1 mM Na₂-EDTA ja saostamalla DNA lisäämällä 2 tilavuutta 100 % etanolia.

10 Bakteriofaagi-DNA otetaan talteen sentrifugoimaolla, pestään 70 % etanolilla ja uudelleensuspendoidaan TE-puskuriliuokseen (TE-puskuriliuos on 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM Na₂-EDTA). Puhdistettu DNA uutetaan tavanomaisesti kerran tai useampia kertoja fenoli:kloroformi:isoamyylialkoholilla (24:24:1), saostetaan etanolin avulla ja uudelleensuspendoidaan 50 - 100 µl:aan TE-puskuriliuosta ennen pilkkomista erilaisilla restriktioentsyymeillä.

Kuudesta rekombinanttifaaagista saatuja DNA-valmis- teita pilkotaan erilaisilla restriktioentsyymeillä ja erotellaan elektroforeesin avulla käyttäen 1 % agarosigeliä. DNA siirretään nitroselluloosalle (Southern) ja hybridisoidaan (24 tuntia 60 °C:ssa liuoksessa, jossa on 2 x SSC, 5 x Denhardtin liuos, 50 mM natriumfosfaattia, pH 7,2, 0,1 % SDS ja 100 µg/ml denaturoitua lohen maidin DNA:ta) radioaktiivisuudella merkittyä 900 emäsparin NcoI/EcoRI-fragmenttia vastaan, joka edustaa 2,1 kiloemäksen EcoRI-fragmentin 3'-aluetta (kuljetuspeptidi ja kypsän proteiinin koodaavan alueen 5'-osa). Suodatin pestään kaksi kertaa 65 °C:ssa liuoksessa, jossa on 0,5 x SSC ja 0,1 % SDS. 900 emäsparin NcoI/EcoRI-fragmentti hybridisoi- tuu sekä A42:n että A52:n 5,5 kiloemäksen XbaI- ja 2,1 ki- loemäksen EcoRI-fragmenttiin. Nämä tiedot ovat yhtäpitäviä Arabidopsis-AHAS:in koodaavan genomisekvensin kloonau- sta ja karakterisointia koskevien julkaistujen tietojen kanssa

35 [Mazur et al., Plant Physiol. 85 (1987) 1110 - 1117].

Bakteriofaagi A52 valitaan lisäanalyysiä varten. A52:n 5,5 kiloemäksen Xbal-fragmentti eristetään 1 % agarosigeelistä ja puhdistetaan käyttäen IBI-elektroeluutiolaitetta kuten valmistaja on ehdottanut. 5,5 kiloemäksen Xbal-fragmentti saostetaan etanolin avulla ja uudelleen-suspendoidaan ddH₂O:teen. Nämä fragmentit yhdistetään liigaation avulla Xbal:llä pilkottuun pSK(-)-plasmidi-DNA:han (hankittu toiminimeltä Stratagene, La Jolla, CA). Fragmentteille suoritetaan ligaatiota 16 - 24 tunnin ajan 14 °C:ssa 20 µl:n tilavuudessa kuten ovat kuvanneet Maniatis et al., supra. Inkuboinnin jälkeen 20 µl:n reaktiotilavuus laimennetaan 100 µl:ksi 100 mM Tris-HCl:lla, pH 7,2. 25 µl tätä näytettä laimennetaan lisäksi 100 µl:ksi 100 mM Tris-HCl:lla, pH 7,2, ja inkuboidaan 100 µl:n kanssa komponentteja HB101-soluja [valmistettu tarkalleen kuten on kuvannut Morrison (Meth. Enzymol. 68 (1979) 326 - 331)]. Plasmidi/E. coli -transformaatioseosta inkuboidaan jään päällä 20 minuutin ajan: siirretään 42 °C:seen 2 minuutin ajaksi; huoneenlämpötilaan 10 minuutin ajaksi; minkä jälkeen lisätään välittömästi 1 ml LB-lientä (LB-liemi on 10 g bactotryptonia; 5 g hiivauutetta; 5 g NaCl ja 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,2, litraa kohti) ja inkuboidaan lisäksi 37 °C:ssa 20 minuutin ajan. DNA-plasmidikloonauskantajat, joita käytetään tässä työssä, sisältävät joko ampicilliinille tai kanamysiinille resistenssin antavan geenin. Sen vuoksi 200 µl kutakin transformaatioseosta sijoitetaan suoraan levyviljelmäksi joko LB_{amp}- tai LB_{kan}-maljoihin (100 µg/µl jompaa kumpaa antibioottia) ja inkuboidaan 37 °C:ssa 12 - 20 tunnin ajan, riippuen kolonioiden koosta.

Kolonioita siirretään 3 ml:aan LB_{amp} tai LB_{kan} ja inkuboidaan yön ajan 37 °C:ssa ravistaen jatkuvasti. Valmistetaan pienen mittakaavan plasmidi-DNA-valmisteita tehden vähäisiä muunnoksia emäksisen lyysin menetelmään, jonka ovat kuvanneet Maniatis et al., supra. Rutiininomaisesti

400 µl 3 ml:n yön ajan kasvatetusta viljelmästä pelletoidaan 1,5 ml:n Eppendorf-putkessa ja uudelleensuspendoidaan 150 µl:aan GTE-liuosta (GTE-liuos on 50 mM glukoosia; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, ja 10 mM Na₂-EDTA) ja inkuboidaan
 5 jään päällä 20 minuutin ajan, minkä jälkeen lisätään 300 µl emäksistä SDS-liuosta ja 200 µl 5 M K⁺/3 M OAc määrätyin aikaväleihin. Lopullinen DNA-pelletti uudelleensuspendoidaan 40 µl:aan liuosta, jossa on 50 µg/µl RNAasi A:ta TE-puskuriliuoksessa. 15 µl plasmidi-DNA:ta poistetaan
 10 restriktiopilkkomista varten. Kaksi plasmidia, pAC301 (5' → 3') ja pAC302 (3' → 5'), edustavat rakennelmia, jotka sisältävät 5,5 kiloemäksen XbaI-fragmentin yhdistettynä ligaation avulla pSK(-):n XbaI-kohtaan. pAC301:n ja pAC302:n lisärestriktioanalyysi varmistaa Arabidopsis-
 15 AHAS:in koodaavan genomisekvenssin promoottorialueen, kuljetuspeptidin, kypsän proteiinin koodaavan alueen ja 3'-vaille translaatiota jäävien alueiden läsnäolon (Mazur et al., supra).

Esimerkki II

20 **Arabidopsis-AHAS:in koodaavan alueen oligonukleotidilla kohdennettu mutageneesi**

a) pAC301:n yksisäikeisen templaatin valmistaminen

Plasmidi pAC301 transformoidaan E. coli -kantaan XL-1 (Stratagene). pAC301:n yksisäikeinen templaatti
 25 kaansadaan tästä pSK(-)-"faagiväliosaa" perustuvasta rakennelmasta noudattaen valmistajan ohjeita. Rutiininomaisesti 3 ml yön ajan kasvatettua SB_{amp}-viljelmää lisätään steriiliin kolviin, joka sisältää 50 ml SB_{amp} (SB on 35 g bactotryptonia, 20 g hiivauutetta, 5 g NaCl ja 10 ml 1 M
 30 Tris-HCl, pH 7,5 litraa kohti) ja inkuboidaan 37 °C:ssa ravistaen jatkuvasti (300 kierrosta minuutissa), kunnes viljelmä saavuttaa optisen tiheyden 0,3 aallonpituudella 600 nm. Tänä ajankohtana viljelmään istutetaan auttajafaa-
 gia R408 (1 x 10¹⁰ faagia) ja voimakasta 10⁶:n ravistamista
 35 nopeudella 300 kierrosta minuutissa 37 °C:ssa jatketaan

yön ajan. Bakteerit pelletoidaan sentrifugoimalla nopeudella 10 000 x g 10 minuutin ajan. Bakteeripelletti heitetään pois ja supernatanttia (noin 45 ml), joka sisältää yksisäikeisen pAC301-templaatin, säilytetään 4 °C:ssa käyttöön asti. Supernatanttia käytetään rutiininomaisesti enintään yhden kuukauden ajan yksisäikeinen faagiväliosavalmisteita varten. Pienen mittakaavan yksisäikeinen pAC301-faagivälios-DNA valmisteita (1,2 ml) valmistetaan oleellisesti kuten valmistaja (Stratagene) on kuvannut.

10 Faagit saostetaan lisäämällä 300 µl liuosta, jossa on 3,5 M NH₄Ac, pH 7,5; 20 % PEG. Liuos sekoitetaan hyvin 1,5 ml:n Eppendorf-putkessa ja inkuboidaan huoneenlämpötilassa 20 minuutin ajan. Yksisäikeiset faagit pelletoidaan sentrifugoimalla 20 minuutin ajan Eppendorf-mikrosentrifugissa.

15 Supernatantti dekantoidaan, pelletti kuivataan ja lopulta uudelleensuspendoidaan 300 µl:aan TE-puskuriliuosta. Faagit liuotetaan lisäämällä 200 µl fenoli:kloroformi:isoamyylialkoholia (24:24:1) ja pyörresekoittamalla 1 minuutin ajan. Tämä vaihe toistetaan vielä kerran, ja

20 sitä seuraa vielä kaksi uuttoa kloroformi:isoamyylialkoholilla (24:1). Lopulliselle vesifaasille suoritetaan saostaminen etanolin avulla (1/10 tilavuutta 5 M K⁺/3 M OAc ja kaksi tilavuutta 100 % etanolilla), pestään 70 % etanolilla, uudelleensuspendoidaan 20 µl:aan TE-puskuriliuosta ja

25 siirretään uuteen 1,5 ml:n Eppendorf-putkeen.

c) Oligonukleotidin valmistaminen

Kaikki oligonukleotidit hankitaan laboratoriolta New England Biolabs. Oligonukleotideja käytetään (1) aminohapon korvauksen aikaansaamiseen Arabidopsis-AHAS:in

30 koodaavan alueen Trp574-jäännöksen kohdalle (Trp → Leu) ja (2) aminohappodelektion tuottamiseen Trp574-aminohappojäännöksen kohdalle.

Trp574 --> Leu-korvaukset

		V	M	Q	W	E	D	R
villityyppi	5'-GTT	ATG	CAA	TGG	GAA	GAT	CGG-3'	
		V	M	Q	L	E	D	R
5 mutantti	5'-GTT	ATG	CAA	TTG	GAA	GAT	CGG-3'	(21-meeri)

Trp574:n deleetio

		V	M	Q	W	E	D	R
villityyppi	5'-GTT	ATG	CAA	TGG	GAA	GAT	CGG-3'	
10 mutantti	5'-G	GTT	ATG	CAA	---	GAA	GAT	CGC- 3'

(21-meeri)

200 ng:lle kutakin oligonukleotidia suoritetaan

15 kinaasivaihtoreaktio ennen hybridisointia pAC301-yksisäikeiseen templaattiin. 40 µl:n reaktiutilavuus sisälsi 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 0,1 mM spermidiniä ja 0,1 mM Na₂-EDTA. Reaktio aloitetaan lisäämällä 10 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia (Pharmacia) ja

20 inkuboidaan 37 °C:ssa 30 minuutin ajan. Reaktio lopetetaan saattamalla reaktioseos 90 °C:seen 3 minuutin ajaksi. Puolet kinaasireaktioseoksesta lisätään 20 µl:n määrään pAC301-yksisäikeistä valmistetta ja inkuboidaan 65 °C:ssa 10 minuutin ajan hybridisaation edistämiseksi. Tähän

25 40 µl:n kinaasi/oligonukleotidiseokseen lisätään 6 µl 1 mM dNTP:eja 6 µl 10 x ligaasipuskuriliuosta (500 mM Tris-HCl, pH 7,5; 70 mM MgCl₂ ja 10 mM DTT), 2 µl 10 mM rATP, 5 yksikköä Klenow-DNA-polymeraasia (Pharmacia), 8 yksikköä DNA-ligaasia (Stratagene) ja 4 µl ddH₂O. Polymeraasi/ligatioreaktioseosta inkuboidaan huoneenlämpötilassa 3 tunnin

30 ajan. Puolet tästä seoksesta käytetään kompetenttien E. coli XL-1-solujen transformointiin. Transformaatioseos levitetään LB_{amp}-maljoille ja inkuboidaan yön ajan 37 °C:ssa. Transformantteja uudelleensivellään uusille

35 LB_{amp}-maljoille ristikkomallin mukaan. Kolonioiden seulonta

hybridisaation avulla suoritettiin tarkalleen kuten on kuvannut Stratagenen tekninen asiakaspalvelu (kesäkuu 1988/pBSII Exo/Mung Bean DNA Sequencing System). Kummatkin oligonukleotidit merkitään ^{32}P :lla kinaasivaihtoreaktion avulla (300 ng oligonukleotidia määrän 40 μCi ^{32}P -ATP läsnä ollessa käyttäen aikaisemmin kuvattuja kinaasin olosuhteita). Liittymätön ^{32}P -ATP poistetaan suorittamalla kinaasi-reaktioseokselle elektroforeesi käyttäen 20 % akryyliamidi/7 M urea -geeliä. Radioaktiivinen vyöhyke, joka vastaa 21-meeristä oligonukleotidia, leikataan pois geelistä partaterällä ja eluoidaan käyttäen joko (1) Maxamin ja Gilbertin murskaus- ja liotusmenetelmää [PNAS USA 74 (1977) 560 - 566] tai (2) elektroeluutiota IBI-elektroeluutiolaitteen avulla. Puhdistettuja radioaktiivisuudella merkittyjä oligonukleotidideja hybridisoidaan nitrosellulosaalla oleviin kolonianäytteisiin ei-rajoittavissa hybridisaatio-olosuhteissa (37 °C 24 tunnin ajan liuoksessa, jossa on 6 x SSC, 5 x Denhardtin liuos, 50 mM Na-P, pH 7,2, ja 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vasikan kateenkorvan DNA:ta). Suodattimet pestään kerran huoneenlämpötilassa liuoksessa, jossa on 6 x SSC ja 50 mM Na-P, pH 7,2, ja jälleen 37 °C:ssa liuoksessa, jossa on 6 x SSC ja 50 mM Na-P, pH 7,2. Lopuksi suodattimia pestään kaksi kertaa 60 °C:ssa kulloinkin 15 minuutin ajan liuoksessa, jossa on 3 M tetrametyyliammoniumkloridia, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ja 1 mg/ml SDS. 21-meerinen oligonukleotidi, jolla on täydellinen emäs emäkseen hybridisaation yhteensopivuus (s.o. mutanttioligo mutanttifaagiväliosaa) ei vapaudu pesemällä faagivääliosa-DNA:sta 60 °C:ssa, kun taas lievä epäsovitus (s.o. mutanttioligo villityypifaagiväliosaa) irttaa vapaaksi pesemällä. Oletettuja positiivisia sivellään alkuperäiseltä LB_{amp} -maljalta uudelle LB_{amp} -maljalle. Kymmenen transformanttia kustakin uudelleensivellystä oletetusta positiivisesta uudelleensivellyllään sitten ristikkomallin mukaan ja koloniahybridisaatio toistetaan. Myöhempiä posi-

tiivisia varmistetaan sitten suorittamalla DNA-sekvenssi-analyysi Trp574:n koodaavan alueen lävitse. [Sanger et al., PNAS USA 74 (1977) 5463 - 5467]. Kaksi positiivista mutanttia, pAC324 (Trp574 → Leu-korvaus) ja pAC325 (Trp574:n deleetio) valittiin lisäanalyysiä varten.

Esimerkki III

Agrobacteriumin välittämä tupakan transformaatio

a) Vektorien kokoonpaneminen

Sekä vektoreita että Agrobacterium-kanta hankitaan toiminimeltä Clontech. Plasmidi pBIN19 on E. coli/Agrobacterium -binaarinen sukkulavektori, jossa on Ti-plasmidi-T-DNA:n sekä vasemman- että oikeanpuoleiset reunasekvenssit, monen restriktioentsyymin tunnistuskohdan sisältävä liittäjä (polylinker), RK2-bakteerireplikaation aloituskohta, joka on toimiva sekä E. colissa että Agrobacteriumissa, ja geeni, joka antaa resistenssin kanamysiinille [Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711 - 8721]. Plasmideja pAC324 ja pAC325 pilkotaan XbaI:llä ja niille suoritetaan elektroforeesi käyttäen 1 % agarosigeeliä. 5,5 kiloemäksen XbaI-palaset, jotka sisältävät pAC324:n tai vastaavasti pAC325:n mutaation, eristetään kuten aikaisemmin on kuvattu. Plasmidia pBIN19 pilkotaan XbaI:llä ja inkuboidaan erillisessä ligaatioreaktioseoksessa pAC324:stä ja pAC325:stä peräisin olevan 5,5 kiloemäksen XbaI-fragmentin kanssa. Koko ligaatioseos transformoidaan E. coli XL-1-soluihin ja positiivisia transformantteja valitaan sinisen/valkea -väriselektion avulla LB_{ai}-maljoilla (LB-maljoja, joissa on 100 µg/µl ampicilliinia, 80 µg/ml X-Gal ja 20 mM IPTG). Pienen mittakaavan plasmidivalmisteiden aikaansaaminen, restriktioentsyymeillä pilkonta -analyysi ja agarosigeelielektroforeesi positiivisten transformanttien varmistamiseksi suoritetaan kuten on kuvattu aikaisemmin. Neljästä BIN19:ään perustuvasta plasmidirakennelmasta pAC348 - pAC349 (Trp574 → Leu-korvauksen sisältävän 5,5 kiloemäksen XbaI-fragmentin kummatkin suunnat

pBIN19:ssä) ja pAC350 - pAC351 (Trp574-deleetion sisältävään 5,5 kiloemäksen XbaI-fragmentin kummatkin suunnat pBIN19:ssä) valitaan yksi rakennelma kustakin mutaatiosta tupakan transformaatiota varten.

- 5 **b) pAC348:n pAC351:n mobilisointi Agrobacteriumiin**
Plasmidi pRK2013 on konjugointiplasmidi, joka sisältää toimintasekvenssit, jotka vaaditaan pBIN19:ään perustuvien rakennelmien mobilisointiin *E. coli*sta vaarattomaksi tehtyyn *Acrobacterium*-kantaan LBA4404 (pAL4404).
10 Tämä *Acrobacterium*-kanta on resistentti streptomysiinille ja sisältää vaarattomaksi tehdyn Ti-plasmidin pAL4404 [Ooms et al., Plasmid 7 (1982) 15 - 29]. Tämä Ti-plasmidi antaa avustuksena toimivat virulenssifunktiot, jotka tarvitaan helpottamaan pBIN19:ssä sijaitsevan T-DNA-alueen
15 siirtämistä tupakan kromosomiin. Kolmen vanhemman välinen pariutuminen pBIN19:ään perustuvien vektorien, konjugointiplasmidin (pRK2013) ja *Agrobacterium*-kannan (LBA4404) kesken suoritetaan oleellisesti kuten on kuvannut Bevan [Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711 - 8721]. Plasmidit
20 pAC348 - pAC351 [Kan_r] transformoidaan kompetentteihin *E. coli* HB101 tai XL-1 -soluihin kuten on kuvattu aikaisemmin. Kunkin plasmidin sisältäviä transformantteja istutetaan 3 ml:aan LB_{kan}-liemiviljelmiä ja inkuboidaan 37 °C:ssa ravistaen jatkuvasti. *Agrobacterium*-kantaa
25 LBA4404 istutetaan AB_{strp}-elatusaineeseen (20 x AB on 20 g NH₄Cl, 6 g MgSO₄·7H₂O, 3 g KCl, 60 g K₂HPO₄, 20 g NAH₂PO₄, 3 g CaCl₂ ja 50 mg FeSO₄·7H₂O. Glukoosia lisätään 1 x kantaliuokseen lopulliseksi pitoisuudeksi 0,5 x) ja inkuboidaan jatkuvasti ravistaen 28 °C:ssa 36 - 48 tunnin ajan. Kolmen
30 vanhemman välinen pariutuminen aloitetaan yhdistämällä 1 ml kustakin kolmesta viljelmästä (pBIN19:ään perustuva rakennelma, pRK2013 ja LBA4404) steriilissä putkessa ja jatkamalla inkubointia 28 °C:ssa 1 tunnin ajan. Viljelämä konsentroidaan tyhjän avulla 0,45 µm:n suodattimelle ja
35 inkuboidaan yön ajan 28 °C:ssa NB-maljalla (NB on 4 g Dif-

co-ravintoliemijauhetta ja 10 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,2). Suodatin pannaan 2 ml:aan tuoretta AB-elatusainetta ja pyöritetään hitaasti 1 tunnin ajan. Laimennussarjaa levitetään AB_{strp/kan}-maljoille ja inkuboidaan 28 °C:ssa 3 - 4 päivän ajan. Ainoastaan Agrobacterium (strp_r), jossa on BIN19:ään perustuva rakennelma (kan_r), kasvaa AB_{strp/kan}-kasvualustallaa. Yksittäisiä kolonioita AB_{strp/kan}-maljoilta istutetaan AB_{strp/kan}-liemeen ja inkuboidaan 28 °C:ssa jatkuvasti ravistaen 36 - 48 tunnin ajan. Näitä viljelmiä uudelleensivellään AB_{strp/kan}-maljoille, inkuboidaan 28 °C:ssa 3 - 4 päivän ajan ja säilytetään 4 °C:ssa käyttöön asti.

c) Agrobacteriumin välittämä tupakan transformaatio

pAC348 ja pAC351 istutetaan 50 ml:aan AB_{kan} ja inkuboidaan jatkuvasti ravistaen 28 °C:ssa 36 - 48 tunnin ajan. Bakteerit pelletoidaan sentrifugoimalla nopeudella 2 500 kierrosta minuutissa 10 minuutin ajan Damon/IEC-pöytäsentrifugissa. Bakteeripelletti uudelleensuspendoidaan 5 ml:aan BAT-elatusainetta (BAT on 1 x MS-suolat [Murashige ja Skoog, Plant Physiol. 15 (1962) 473 - 497], 1 x B₅-vitamiinit [100 x B₅ on 10 mg myoinositolia, 100 mg nikotiinihappoa, 100 mg pyridoksiini-HCl ja 1 000 mg tiamiini-HCl 1 litraa kohti], 3 % sakkaroosia, 5 µM 6-bentsyyliaminopuriinia pH-arvossa 5,7). Nuoria kasvihuoneessa kasvatettuja Wisconsin 38 -tupakanlehtiä leikataan kahdeksi pituussuunnassa leikatuksi kappaleeksi ja liotetaan lämpimässä vedessä, joka sisältää Ivory-käsisäippuaa. Lehdenkappaleet pestään steriilissä tislatussa vedessä, liotetaan liuoksessa, jossa on 10 % Clorox + Tween 20, 10 minuutin ajan sekoittaen ja huuhdotaan kolme kertaa ddH₂O:lla. Lehdenkappaleista leikataan kiekkoja käyttäen joko korkkiporaa tai lävistintä. Nämä kiekot pannaan 50 ml:n putkeen, joka sisältää uudelleensuspendoidun Agrobacterium-viljelmän. Suspensiota sekoitetaan lievästi 5 minuutin ajan ja kaadetaan steriilille paperipyyhkeelle ja sijoitetaan kasvatettavaksi BAT-kasvualustamaljoille (100 x 20 mm:n maljoja, joilla on noin 10 kiekkoa maljaa

kohti). Maljoja inkuboidaan 25 °C:ssa fluoriloistevalais-
 tuksessa 48 tunnin ajan. Kiekot siirretään sitten selek-
 tiokasvualustalle (BATCK; BAT-kasvualusta plus karbenisil-
 liiniä ja kanamysiiniä) ja palautetaan alkuperäisiin inkubatio-olosuhteisiin, kunnes muodostuu versoja. Kanamysiini-
 5 niresistenttejä versoja siirretään OTCK (juurrutus) -selektiokasvualustalle (OTCK-kasvualusta on BATCK-alusta, josta puuttuu 6-bentsyyliaminopuriini) (GA7-) Magenta-laatikoihin ja aikaisemmin kuvattuja inkubointiolosuhteita
 10 jatketaan. Kun kanamysiinille resistentit versot muodostavat näkyviä juuristoja (vähintään 3 juurta, jotka ovat pituudeltaan yli 1 cm), kasvit siirretään multa. Lyhyesti kuvattuna agarissa sijaitseva verso poistetaan GA7-laatikosta, agar pestään varovaisesti pois lämpimällä vesi-
 15 johtovedellä ja versot siirretään Metro Mix -alustaan turveruukkuihin GA7-laatikoihin. Kasvit pannaan kasvihuoneeseen ja niiden annetaan kovettua. Kaikkiaan 5 kanamysiinille resistenttiä versoa, jotka sisältävät pAC348:n, ja
 20 9 kanamysiinille resistenttiä versoa, jotka sisältävät pAC350:n, siirretään multa. Noin 10 - 14 päivää myöhemmin, turveruukuista suoritetaan istuttaminen suurempiin ruukkuihin.

	pAC348	pAC351
25	transformantti #:	transformantti #:
	1) 19-1	1) 10-1
	2) 33-1	2) 20-1
	3) 33-2	3) 20-2
	4) 46-1	4) 20-3
30	5) 46-2	5) 27-1
		6) 27-2
		7) 27-3
		8) 30-1
		9) 42-4

Esimerkki IV

Herbisidiresistenssin antavien mutanttien määrittäminen ja karakterisointi

AHAS-entsyymimääritys (lehtikudos)

5 Vähän aikaa kasvihuoneeseen siirtämisen jälkeen valmistetaan uutteita kustakin kanamysiinille resistentistä transformantista ja tutkitaan epäherkkyys imidatsolinoniherbisidille Pursuit^R. Asetohydroksihapposyntaasi eristetään ja tutkitaan kuten on kuvattu aikaisemmassa kappaleessa. Kaksi kanamysiinille resistenttiä transformanttia (33-1 ja 46-2), jotka sisältävät Arabidopsis-AHAS-alleelin Trp574 → Leu-korvausmutanttialleelin, osoittavat AHAS-aktiivisuutta Pursuit^R-herbisidin läsnä ollessa. Lisäksi yhden kanamysiinille resistentin deleetiotransformantin (10-1) AHAS-aktiivisuus osoittaa epäherkkyyttä Pursuit^R-herbisidin lisäämiselle (kuvio 7). Tälle Trp574-deleetiotransformantille suoritetaan itsesiitos ja se takaisinristeytetään Wisconsin 38:n kanssa. 10-1:n jälkeläiset osoittavat sietokykyä Pursuit^R-herbisidin emergenssin jälkeläisille käytöille, jotka ovat määrältään 4 - 8 kertaa suurempia kuin kontrollitupakkakasveille tappava pitoisuus.

Kuviot 2 a) - c) esittävät yllä tarkasteltujen risteytysten ja kontrollien fenotyyppien valokuvavertailuja. Nämä havainnot osoittavat transformoidun lehtikudoksen alkuperäisessä AHAS-määrityksessä havaitun resistenssin periytymisen ja tämän piirteen ilmenemisen koko kasvin tasolla.

Kvantitatiivisemmassa määrityksessä transgeenisen tupakkakasvin (10-1), joka sisältää Arabidopsis-AHAS:in Trp-574-deleetiomutaation, itsesiitettujen jälkeläisten siemieniä samoin kuin myös herkän vanhemmaislahin "Wisconsin 38" siemieniä istutetaan Metro Mix 350TM -alustaan 13 cm:n Azalea-ruukkuihin. Taimet harvennetaan yhdeksi ainoaksi kaikkein voimakkaimmaksi taimeksi kahden päivän jälkeen. Yksitoista päivää myöhemmin nämä kasvit suihku-

tetaan emergenssin jälkeen Pursuit^R-herbisidillä käyttäen määriä 0, 10, 20, 40, 80 ja 160 g/ha. Viisi kasvia kumpaa-kin tupakkatyyppejä (transgeeninen ja kontrolli) suihkute-
 5 taan herbisidimäärää kohti. Tween 20TM lisätään määränä 0,25 tilavuutta/tilavuus herbisidiliuoksiin ennen suihkut-
 tamista. Herbisidi annetaan laboratoriohihnasuihkuttimen avulla määränä 400 l/ha 45 cm:n etäisyydeltä kasvien ylä-
 puolelta käyttäen hihnan nopeutta 8,2 s/kierros ja suihku-
 10 suutinta #65015E. Kasvien korkeus mitataan 1, 2, 3 ja 4 viikkoa käsittelyn jälkeen, kasvien tuorepainotiedot koo-
 taan neljän ja puolen viikon kuluttua.

Näiden suihkutusten tulokset on kuvattu kuviossa 4. Jälkeläisten tiedot on graafisessa esityksessä esitetty siten, että sietokykyisin yksilö on ensimmäisenä ja herkin
 15 yksilö viimeisenä kullakin herbisidimäärällä. Kuten voi-
 daan nähdä tästä graafisesta esityksestä ja kuten on odo-
 tettavissa alkuperäisen transgeenisen kasvin itsesiitetty-
 jen jälkeläisten tapauksessa, jälkeläiset osoittavat her-
 bisidin sietokyvyn segregatiota. Voidaan havaita sekä
 20 herkkiä jälkeläisiä että yksilöitä, joilla on vaihtelevas-
 sa määrin herbisidinsietokykyä.

Kasvien tuorepainot (g) ja keskiarvot kullakin her-
 bisidimäärällä on esitetty taulukossa 2 ja keskimääräisis-
 tä tuorepainoista (g) on esitetty yhteenveto alla (tauluk-
 25 ko 1):

Taulukko 1

	Tupakan keskimääräi- nen tuorepaino: (5 rinnakkaista kutakin)		Transgeeniset jälkeläiset
	<u>Kontrolli</u>		
30	Herbisidimäärä:		
	0 g/ha	52,1	53,7
	10 g/ha	8,1	36,4
	20 g/ha	2,0	28,8
	40 g/ha	0,8	20,9
35	80 g/ha	0,6	26,5
	160 g/ha	0,2	21,4

Kuten tästä taulukosta voidaan nähdä, transgeenisen tupakkakasvin (10-1) itsesiitetyt jälkeläiset osoittavat suurta sietokykyä Pursuit^R kohtaan, kun se on lisätty emergenssin jälkeen. Herkkä vanhemmaislaaji ei osoita herbisidinsietokykyä millään testatuista määristä.

Tutkitaan myös transgeenisen kasvin 10-1 tuottamien siementen vastustuskyky imidatsolinonia Pursuit^R kohtaan. Siemieniä istutetaan kasvualustaan, joka sisältää Pursuit_R:ää määrinä 0, 1,25, 2,5, 3,75 ja 5,0 µM. Kaksikymmentä siementä istutetaan petrimaljaa kohti käyttäen kahta maljaa käsittelyä kohti. Taimien herbisidinsietokyky arvioidaan kolmen viikon kuluttua. Käsittelyn määrällä 5,0 µM tulokset on esitetty taulukossa 2. Pienimmälläkin pitoisuudella (käsittely määrällä 1,25 µM) kontrollikasvit osoittivat herkkyyttä herbisidille. Nämä tulokset valaisevat herbisidiresistenssipiirteiden periytymistä vanhemmais-kasvilta 10-1 sen jälkeläisille.

Taulukko 2
Tupakan siementen kokeen tulokset

Pursuit ^R - pitoisuus (µM):		S*	D	R
Jälkeläiset:	W38 (villityyppi)	20	0	0
		20	0	0
	10-1	7	6	6
	itsesiitetty	3	11	6
	10-1 x 0	11	9	0
		11	9	0
	0 x 10-1	10	9	0
		8	8	0

*S = herkkä; D = vahingoittunut; R = resistentti

Esimerkki V**AHAS-entsyymimääritys E. colissa**

AHAS-entsyymimääritys (ilmentyminen E. colissa) -
 Kohdennetun mutageneesin avulla saatuja mutantteja pAC224
 5 ja pAC225 käytetään templaatteina E. coliin perustuvan
 ilmentämisjärjestelmän aikaansaamiseksi. Epäherkkyys her-
 bisidille testataan, kun kiinnostuksen kohteena oleva kor-
 keamman kasvin geeni ilmentyy bakteerikannassa, joka on
 vailla mitään endogeenistä AHAS-aktiivisuutta. Tätä tar-
 10 koitusta varten villityyppi-Arabidopsis-AHAS:in (pAC301),
 Trp574-Leu-korvauksen (pAC224) ja Trp574:n deleetion
 (pAC225) NcoI/PstI-fragmentti subkloonataan E. coli -il-
 mentämisvektorin pKK233-2 (hankittu toiminimeltä Pharma-
 cia) NcoI/PstI-kohtaan. Tämä ilmentämisplasmidi sisältää
 15 IPTG-induoituvan promoottorin sekä transkriptionterminaa-
 tiosekvenssin. Nämä alueet ympäröivät NcoI-, HindIII- ja
 PstI-liittäjäsekvenssiä, joka mahdollistaa kiinnostuksen
 kohteena olevan geenin liittämisen oikean suuntaisena bak-
 teeripromoottoriin nähden. Kulloistenkin NcoI/PstI-frag-
 20 menttien subkloonaaminen ja ligaatio NcoI/PstI:llä pilkot-
 tuun pKK233-2-DNA:han (ampisilliiniresistenssi) tapahtuu
 kuten on kuvattu aikaisemmin. Ligaatioreaktioseos trans-
 formoidaan E. coli -kantaan MF2000 [ilvB800:mu-1, Bgl32,
 ilvI15, thi-1, argE3, RPSL31, (ara-leu, ilvHI) 863, mtl-1,
 25 xyl-5, galK2, lacYI, recA1]. Tästä bakteerikannasta puut-
 tuu endogeeninen AHAS-aktiivisuus. Sen vuoksi MF2000-kan-
 nan, joka on transformoitu joko pAC224:llä (Trp574-Leu)
 tai pAC225:llä (Trp-del), kasvu vähimmäiskasvualustalla,
 josta puuttuu isoleusiini ja valiini (sen aminohapobiosyn-
 30 teesireitin, johon AHAS-entsyymi liittyy, lopputuottei-
 ta), vaatii Arabidopsis-geenin ilmentymistä ja toimintaa
 E. colissa. Kukin kolmesta rakennelmasta täydentää
 MF2000:ta sekä agarkasvualustalla että liemiviljelmissä.
 MF2000:n, joka sisältää joko plasmidirakennelman
 35 pAC210, pAC224 tai pAC225, yksittäisiä kolonioita istute-

taan 3 ml:n liemiviljelmiksi, joissa on aminohappoja arginiini, leusiini, isoleusiini ja valiini sisältävää M63-vähimmäiselatusainetta (amp). [M63 on 30 g KH_2PO_4 , 70 g K_2HPO_4 , 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mg FeSO_4 , 100 μl 1 M MgSO_4 , 200 μl tiamiinia. Glukoosipitoisuus nostetaan 1,2 %:ksi]. Viljelmiä inkuboidaan yön ajan 37 °C:ssa ravistaen jatkuvasti. Bakterisolut pelletoidaan, uudelleensuspendoidaan useaan ml:aan M63 (amp), johon on lisätty arginiinia ja leusiinia, mutta josta puuttuu isoleusiini ja valiini (minus ilv-elatusaine). Solut siirretään 10 - 50 ml:aan minus ilv-elatusainetta ja jatkuvaa ravistamista 37 °C:ssa jatketaan yön ajan. Solut pelletoidaan ja joko käytetään suoraan AHAS-entsyymimäärityksissä tai jäädytetään -20 °C:seen käyttöön asti.

Bakteerisoluiissa olevan Arabidopsis-AHAS:in eristäminen ja määrittäminen tapahtuu oleellisesti kuten ovat kuvanneet Singh et al. [J. Chromatography 444 (1988) 251 - 261]. Bakteeripelletti hienonnetaan nesteytetyssä työssä ja homogenoidaan 100 mM kaliumfosfaattipuskuriliuoksessa (pH 7,5), joka sisältää 10 mM pyruvaattia, 5 mM magnesiumkloridia, 5 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 100 μM flaviiniadeniinidinukleotidia (FAD), 1 mM valiinia, 1 mM leusiinia, 10 % (tilavuus/-tilavuus) glyserolia ja 10 mM kysteiiniä. Homogenaatti suodatetaan nailonkankaan lävitse (53 μm :n mesh) ja sentrifugoidaan nopeudella 25 000 x g 20 minuutin ajan. Supernatanttifraktio saatetaan 50 % kyllästetyksi ammoniumsulfaattilla ja seisoitetaan 20 - 30 minuutin ajan jään päällä. Saostuma pelletoidaan sentrifugoimalla nopeudella 25 000 x g 20 minuutin ajan. Supernatantti heitetään pois ja ammoniumsulfaattipelletti käytetään välittömästi tai jäädytetään nesteytetyn typen avulla ja säilytetään -20 °C:ssa käyttöön asti.

AHAS-aktiivisuus herbisidin läsnä ollessa tai ilman herbisidiä mitataan arvioimalla tuote asetolaktaatti sen jälkeen kun se on muuttunut happaman dekarboksylaation

avulla asetoiiniksi. Standardireaktioseokset sisältävät entsyymien (ja herbisidin) 50 mM kaliumfosfaattipuskuriliuoksessa (pH 7,0), joka sisältää 100 mM natriumpyruvaattia, 10 mM magnesiumkloridia, 1 mM tiamiinipyrofosfaattia (TPP) ja 10 μ M FAD. Tätä seosta inkuboidaan 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Reaktio pysäytetään lisäämällä rikkihappoa lopulliseksi pitoisuudeksi 0,85 %. Reaktiotuotteen annetaan dekarboksyloitua 60 °C:ssa 15 minuutin ajan. Muodostunut asetoiini määritetään inkuboimalla kreatiinin (0,17 %) ja 1-naftolin (1,7 %) kanssa Westerfieldin menetelmän mukaan (J. Biol. Chem. 161 (1945) 495 - 502). Tehdään suoraa asetoiinin muodostumista koskevia sopivia tarkistuksia entsyymimääritysten aikana.

Villityyppi-Arabidopsis-AHAS (pAC201) on herkkä imidatsolinoniherbisidille Pursuit^R ja sulfonyyliureaherbisidille Glean^R, kun taas sekä Trp574-Leu-korvaus (pAC224) ja Trp574:n deleetio (pAC225) ovat epäherkkiä Pursuit^R-herbisidin (kuvio 4) ja Glean^R-herbisidin (kuvio 5) suureneville pitoisuuksille. Yllättäen deleetio antaa näitä herbisidejä kohtaan epäherkkyyden, joka on yhtä suuri kuin vastaavan korvauksen antama tai suurempi. Sen vuoksi Arabidopsis-AHAS:in koodaavan alueen Trp574-jäännöksen deleetio johtaa toimivaan entsyymien muotoon, joka on epäherkkä kumman tahansa kahdesta sellaisesta toisistaan muistuttamattomasta herbisidistä lisäämiselle, jotka kykenevät estämään entsyymien villityyppimuotoa.

Yllä mainittuja menetelmiä käytetään myös asemassa 653 olevan seriinin korvaamiseen asparagiinilla yhtä hyvin kuin deleetion aikaansaamiseen tässä asemassa. Plasמידit, jotka sisältävät korvauksen (pAC229) tai deleetion (pAC230), transformoidaan E. coli MF2000:teen ja deleetio- ja korvausmutanttien AHAS-aktiivisuus herbisidien Pursuit^R ja Glean^R läsnä ollessa määritetään kunkin tapauksessa kuten yllä on kuvattu. Seriinin korvaamisen asparagiinilla tuottama AHAS on epäherkkä Pursuit^R:n aiheuttamalle estämi-

selle (kuvio 6), kuten aikaisemmin on selostettu (Sthasi-
 van et al., supra), mutta herkkyys Glean^R:lle oli vähenty-
 nyt ainoastaan lievästi (noin 10 %) verrattuna villityyp-
 pientsyymiin (kuvio 7). Sitä vastoin Ser653-deleetion
 5 tuottama AHAS on erittäin resistentti sekä Pursuit^R:n että
 Glean^R:n aiheuttamalle estämiselle (kuviot 6 ja 7).

Biologisten materiaalien talletus

Seuraavat mikro-organismit talletettiin kokoelmaan
 the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn
 10 Drive, Rockville, Maryland, 20857, 6. joulukuuta, 1990, ja
 niille annettiin seuraavat talletusnumerot:

	<u>Mikro-organismi</u>	<u>Talletusnumero</u>
15	Agrobacterium-kanta LBA4404, jossa on pAC351 (Agro/351) [Trp574-deleetio]	68488
20	Agrobacterium-kanta LBA4404, jossa on plasmidi pAC324 [Ser653-deleetio]	68489

Patenttivaatimukset:

1. Nukleiinihapposekvenssi, joka koodaa funktionaalisen AHAS-entsyymin, t u n n e t t u siitä, että
5 kyseisen entsyymin aminohapposekvenssi eroaa villityyppi-AHAS-sekvenssistä siten, että siinä on vähintään yksi aminohappodeleetio, joka antaa entsyymille herbisidiresistenssin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen sekvenssi,
10 t u n n e t t u siitä, että siinä on deleetio läsnä AHAS-sekvenssin säilytetyllä alueella.

3. Patenttivaatimuksen 1 - 2 mukainen sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että siinä on tapahtunut deleetio Arabidopsis-villityyppi-AHAS-sekvenssin alueella, joka on
15 valittu ryhmästä, jonka muodostavat aminohapot 119 - 122, 194 - 197, 201 - 208, 255 - 257, 348 - 353, 373 - 377, 569 - 578 ja 650 - 653 tai homologiset alueet eri lajissa.

4. Patenttivaatimusten 1 - 3 mukainen sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että siinä esiintyy deleetio vähintään yhdessä asemassa, joka on valittu ryhmästä, jonka
20 muodostavat aminohapot 121, 122, 197, 205, 256, 351, 376, 571, 574, 578 ja 653.

5. Patenttivaatimusten 1 - 4 mukainen sekvenssi, t u n n e t t u siitä, että siinä resistenssi on vähintään yhtä sellaista herbisidiä vastaan, joka on valittu
25 ryhmästä, jonka muodostavat imidatsolinoni, sulfonyyliurea ja triatsolopyrimidiini.

6. Funktionaalinen AHAS-entsyymi, t u n n e t t u siitä, että sen aminohapposekvenssi eroaa villityyppi-AHAS-sekvenssistä siten, että siinä on vähintään yksi ami-
30 nohappodeleetio, joka antaa herbisidiresistenssin.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen entsyymi, t u n n e t t u siitä, että siinä deleetio on tapahtunut AHAS-sekvenssin säilytetyllä alueella.

8. Patenttivaatimusten 6 - 7 mukainen entsyymi, t u n n e t t u siitä, että siinä on tapahtunut deleetio Arabidopsis-villityyppi-AHAS-sekvenssin alueella, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat aminohapot 119 - 122, 194 - 197, 201 - 208, 255 - 257, 348 - 353, 373 - 377, 569 - 578 ja 650 - 653 tai homologinen alue eri lajissa.

9. Patenttivaatimusten 6 - 8 mukainen entsyymi, t u n n e t t u siitä, että siinä deleetio on tapahtunut vähintään yhdessä asemassa, joka on valittu ryhmästä, jonka muodostavat aminohapot 120, 121, 197, 205, 256, 358, 571, 574, 578 ja 653.

10. Vektori, joka sisältää funktionaalisen AHAS-entsyymin koodaavan nukleiinihapposekvenssin, t u n n e t t u siitä, että kyseisen entsyymin aminohapposekvenssi eroaa villityyppi-AHAS:ista siten, että siinä on vähintään yksi aminohappodeleetio, joka antaa entsyymille herbisidiresistenssin.

11. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 5 mukaisen nukleiinihapposekvenssin sisältävä isäntäsolu.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukaisen vektorin sisältävä isäntäsolu.

13. Kasvisolu, joka sisältää funktionaalisen AHAS-entsyymin koodaavan nukleiinihapposekvenssin, t u n n e t t u siitä, että kyseisen entsyymin aminohapposekvenssi eroaa villityyppi-AHAS-sekvenssistä siten, että siinä on vähintään yksi aminohappodeleetio, joka antaa entsyymille herbisidiresistenssin.

14. Herbisidiresistentti kypsä kasvi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää funktionaalisen AHAS-entsyymin koodaavan nukleiinihapposekvenssin, jonka mainitun entsyymin aminohapposekvenssi eroaa villityyppi-AHAS-sekvenssistä siten, että siinä on vähintään yksi aminohappodeleetio, joka antaa entsyymille herbisidiresistenssin.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukaisen kasvin siemen.

16. Patenttivaatimuksen 14 mukaisen kasvin siitepöly.

17. Menetelmä herbisidiresistenssin antamiseksi kasvisolulle, t u n n e t t u siitä, että järjestetään kasvisoluun funktionaalisen AHAS-entsyymin koodaava nukleiinihapposekvenssi, jonka mainitun entsyymin aminohapposekvenssi eroaa villityyppi-AHAS-sekvenssistä siten, että siinä on vähintään yksi aminohappodeleetio, joka antaa entsyymille herbisidiresistenssin.

18. Menetelmä herbisidiresistenttien kasvien kasvattamiseksi, t u n n e t t u siitä, että kasvatetaan estävän määrän herbisidiä läsnä ollessa kasvi, joka tuottaa funktionaalista AHAS-entsyymiä, jonka aminohapposekvenssi eroaa villityyppi-AHAS-sekvenssistä siten, että siinä on vähintään yksi aminohappodeleetio, joka antaa entsyymille herbisidiresistenssin.

19. Menetelmä kiinnostuksen kohteena olevalla geenillä onnistuneesti transformoitujen isäntäsolujen valitsemiseksi, t u n n e t t u siitä, että tarjotaan aiotuille isäntäsoluille kiinnostuksen kohteena oleva geeni liitettynä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 5 mukaiseen nukleiinihapposekvenssiin, kasvatetaan soluja estävän määrän herbisidiä läsnä ollessa ja identifioidaan eloon jääviä soluja kiinnostuksen kohteena olevan geenin sisältävinä.

20. Nukleiinihapporakenne, t u n n e t t u siitä, että se sisältää minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 5 mukaisen sekvenssin liitettynä geeniin, joka koodaa maataloudellisesti hyödyllisen piirteen.

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

FIG.1a(i)

Ser	Ile	Thr	Lys	His	Asn	Tyr	Leu	Val	Met	Asp	Val		
			220					225					
Glu	Asp	Ile	Pro	Arg	Ile	Ile	Glu	Glu	Ala	Phe	Phe		
	230					235					240		
Leu	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg	Pro	Gly	Pro	Val	Leu	Val		
				245					250				
Asp	Val	Pro	Lys	Asp	Ile	Gln	Gln	Gln	Leu	Ala	Ile		
		255					260						
Pro	Asn	Trp	Glu	Gln	Ala	Met	Arg	Leu	Pro	Gly	Tyr		
	265				270					275			
Met	Ser	Arg	Met	Pro	Lys	Pro	Pro	Glu	Asp	Ser	His		
			280					285					
Leu	Glu	Gln	Ile	Val	Arg	Leu	Ile	Ser	Glu	Ser	Lys		
	290					295					300		
Lys	Pro	Val	Leu	Tyr	Val	Gly	Gly	Gly	Cys	Leu	Asn		
				305					310				
Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Gly	Arg	Phe	Val	Glu	Leu	Thr		
		315					320						
Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Gly	Leu	Gly		
	325				330					335			
Ser	Tyr	Pro	Cys	Asp	Asp	Glu	Leu	Ser	Leu	His	Met		
			340					345					
Leu	Gly	Met	His	Gly	Thr	Val	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Ala		
	350					355					360		
Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Val		
				365					370				
Arg	Phe	Asp	Asp	Arg	Val	Thr	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala		
		375					380						
Phe	Ala	Ser	Arg	Ala	Lys	Ile	Val	His	Ile	Asp	Ile		
	385				390					395			
Asp	Ser	Ala	Glu	Ile	Gly	Lys	Asn	Lys	Thr	Pro	His		
			400					405					
Val	Ser	Val	Cys	Gly	Asp	Val	Lys	Leu	Ala	Leu	Gln		
	410					415					420		
Gly	Met	Asn	Lys	Val	Leu	Glu	Asn	Arg	Ala	Glu	Glu		
				425					430				

FIG.1a(ii)

Leu	Lys	Leu	Asp	Phe	Gly	Val	Trp	Arg	Asn	Glu	Leu	435	440
Asn	Val	Gln	Lys	Gln	Lys	Phe	Pro	Leu	Ser	Phe	Lys	445	450 455
Thr	Phe	Gly	Glu	Ala	Ile	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Ile	460	465
Lys	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Thr	Asp	Gly	Lys	Ala	Ile	470	475 480
Ile	Ser	Thr	Gly	Val	Gly	Gln	His	Gln	Met	Trp	Ala	485	490
Ala	Gln	Phe	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Lys	Pro	Arg	Gln	Trp	495	500
Leu	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Gly	Phe	Gly	505	510 515
Leu	Pro	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Ser	Val	Ala	Asn	Pro	520	525
Asp	Ala	Ile	Val	Val	Asp	Ile	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	530	535 540
Phe	Ile	Met	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr	Ile	Arg	545	550
Val	Glu	Asn	Leu	Pro	Val	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Asn	555	560
Asn	Gln	His	Leu	Gly	Met	Val	Met	Gln	Trp	Glu	Asp	565	570 575
Arg	Phe	Tyr	Lys	Ala	Asn	Arg	Ala	His	Thr	Phe	Leu	580	585
Gly	Asp	Pro	Ala	Gln	Glu	Asp	Glu	Ile	Phe	Pro	Asn	590	595 600
Met	Leu	Leu	Phe	Ala	Ala	Ala	Cys	Gly	Ile	Pro	Ala	605	610
Ala	Arg	Val	Thr	Lys	Lys	Ala	Asp	Leu	Arg	Glu	Ala	615	620
Ile	Gln	Thr	Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Gly	Pro	Tyr	Leu	625	630 635
Leu	Asp	Val	Ile	Cys	Pro	His	Gln	Glu	His	Val	Leu	640	645

FIG.1a(iii)

Pro	Met	Ile	Pro	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Asn	Asp	Val
	650					655					660
Ile	Thr	Glu	Gly	Asp	Gly	Arg	Ile	Lys	Tyr		
				665					670		

FIG.1a(iiii)

NTRAAARAAA	GAAAGAAAGA	TCAATTTGAT	AAATTTCTCA	40
GCCACAAATT	CTACATTTAG	GTTTTAGCAT	ATCGAAGGCT	80
CAATCACAAA	TACAATAGAT	AGACTAGAGA	TTCCAGCGTC	120
ACGTGAGTTT	TATCTATAAA	TAAAGGACCA	AAAATCAAAT	160
CCCGAGGGCA	TTTTCGTAAT	CCAACATAAA	ACCCTTAAAC	200
TTCAAGTCTC	ATTTTAAAC	AAATCATGTT	CACAAGTCTC	240
TTCTTCTTCT	CTGTTTCTCT	ATCTCTTGCT	CATCTTTCTC	280
CTGAACCATG	GCGGCGGCAA	CAACAACAAC	AACAACATCT	320
TCTTCGATCT	CCTTCTCCAC	CAAACCATCT	CCTTCCTCCT	360
CCAAATCACC	ATTACCAATC	TCCAGATTCT	CCCTCCCATT	400
CTCCCTAAAC	CCCAACAAAT	CATCCTCCTC	CTCCCGCCGC	440
CGCGGTATCA	AATCCAGCTC	TCCCTCCTCC	ATCTCCGCCG	480
TGCTCAACAC	AACCACCAAT	GTCACAACCA	CTCCCTCTCC	520
AACCAAACCT	ACCAAACCCG	AAACATTTCAT	CTCCCGATTG	560
GCTCCAGATC	AACCCCGCAA	AGGCGCTGAT	ATCCTCGTCG	600
AAGCTTTAGA	ACGTCAAGGC	GTAGAAACCG	TATTCGCTTA	640
CCCTGGAGGT	GCATCAATGG	AGATTCACCA	AGCCTTAACC	680
CGCTCTTCCT	CAATCCGTAA	CGTCCTTCCT	CGTCACGAAC	720
AAGGAGGTGT	ATTCGCAGCA	GAAGGATACG	CTCGATCCTC	760
AGGTAAACCA	GGTATCTGTA	TAGCCACTTC	AGGTCCCGGA	800
GCTACAAATC	TCGTTAGCGG	ATTAGCCGAT	GCGTTGTTAG	840
ATAGTGTTCC	TCTTGTAGCA	ATCACAGGAC	AAGTCCCTCG	880
TCGTATGATT	GGTACAGATG	CGTTTCAAGA	GACTCCGATT	920
GTTGAGGTAA	CGCGTTCGAT	TACGAAGCAT	AACTATCTTG	960
TGATGGATGT	TGAAGATATC	CCTAGGATTA	TTGAGGAAGC	1000
TTTCTTTTTA	GCTACTTCTG	GTAGACCTGG	ACCTGTTTTG	1040
GTTGATGTTC	CTAAAGATAT	TCAACAACAG	CTTGCGATTC	1080

FIG.1b(i)

CTAATTGGGA ACAGGCTATG AGATTACCTG GTTATATGTC	1120
TAGGATGCCT AAACCTCCGG AAGATTCTCA TTTGGAGCAG	1160
ATTGTTAGGT TGATTTCTGA GTCTAAGAAG CCTGTGTTGT	1200
ATGTTGGTGG TGGTTGTTTG AATCTAGCG ATGAATTGGG	1240
TAGGTTTGTT GAGCTTACGG GGATCCCTGT TGCAGTACG	1280
TTGATGGGGC TGGGATCTTA TCCTTGTGAT GATGAGTTGT	1320
CGTTACATAT GCTTGGAATG CATGGGACTG TGTATGCAAA	1360
TTACGCTGTG GAGCATAGTG ATTTGTTGTT GCGGTTTGGG	1400
GTAAGGTTTG ATGATCGTGT CACGGGTAAG CTTGAGGCTT	1440
TTGCTAGTAG GGCTAAGATT GTTCATATTG ATATTGACTC	1480
GGCTGAGATT GGAAGAATA AGACTCCTCA TGTGTCTGTG	1520
TGTGGTGATG TTAAGCTGGC TTTGCAAGGG ATGAATAAGG	1560
TTCTTGAGAA CCGAGCGGAG GAGCTTAAGC TTGATTTTGG	1600
AGTTTGAGAG AATGAGTTGA ACGTACAGAA ACAGAAGTTT	1640
CCGTTGAGCT TTAAGACGTT TGGGGAAGCT ATTCCTCCAC	1680
AGTATGCGAT TAAGGTCCTT GATGAGTTGA CTGATGGAAA	1720
AGCCATAATA AGTACTGGTG TCGGGCAACA TCAAATGTGG	1760
GCGGCGCAGT TCTACAATTA CAAGAAACCA AGGCAGTGGC	1800
TATCATCAGG AGGCCTTGGG GCTATGGGAT TTGGACTTCC	1840
TGCTGCGATT GGAGCGTCTG TTGCTAACCC TGATGCGATA	1880
GTTGTGGATA TTGACGGAGA TGGAAGCTTT ATAATGAATG	1920
TGCAAGAGCT AGCCACTATT CGTGTAGAGA ATCTTCCAGT	1960
GAAGGTACTT TTATTAAACA ACCAGCATCT TGGCATGGTT	2000
ATGCAATGGG AAGATCGGTT CTACAAAGCT AACCGAGCTC	2040
ACACATTTCT CGGGGATCCG GCTCAGGAGG ACGAGATATT	2080
CCCGAACATG TTGCTGTTTG CAGCAGCTTG CGGGATTCCA	2120
GCGGCGAGGG TGACAAAGAA AGCAGATCTC CGAGAAGCTA	2160

FIG.1b(ii)

TTCAGACAAT GCTGGATACA CCAGGACCTT ACCTGTTGGA	2200
TGTGATTTGT CCGCACCAAG AACATGTGTT GCCGATGATC	2240
CCGAGTGGTG GCACTTTCAA CGATGTCATA ACGGAAGGAG	2280
ATGGCCGGAT TAAATACTGA GAGATGAAAC CGGTGATTAT	2320
CAGAACCTTT TATGGTCTTT GTATGCATAT GGTAACAAAA	2360
CTTAGTTTGC AATTTCCCTGT TTGTTTTGGT AATTTGAGTT	2400
TCTTTTAGTT GTTGATCTGC CTGCTTTTTG GTTTACGTCA	2440
GACTACTACT GCTGTTGTTG TTTGGTTTCC TTTCTTTCAT	2480
TTTATAAATA AATAATCCGG TTCGGTTTAC TCCTTGTGAC	2520
TGGCTC	2526

FIG.1b(iii)

FIG.2a



FIG. 2b

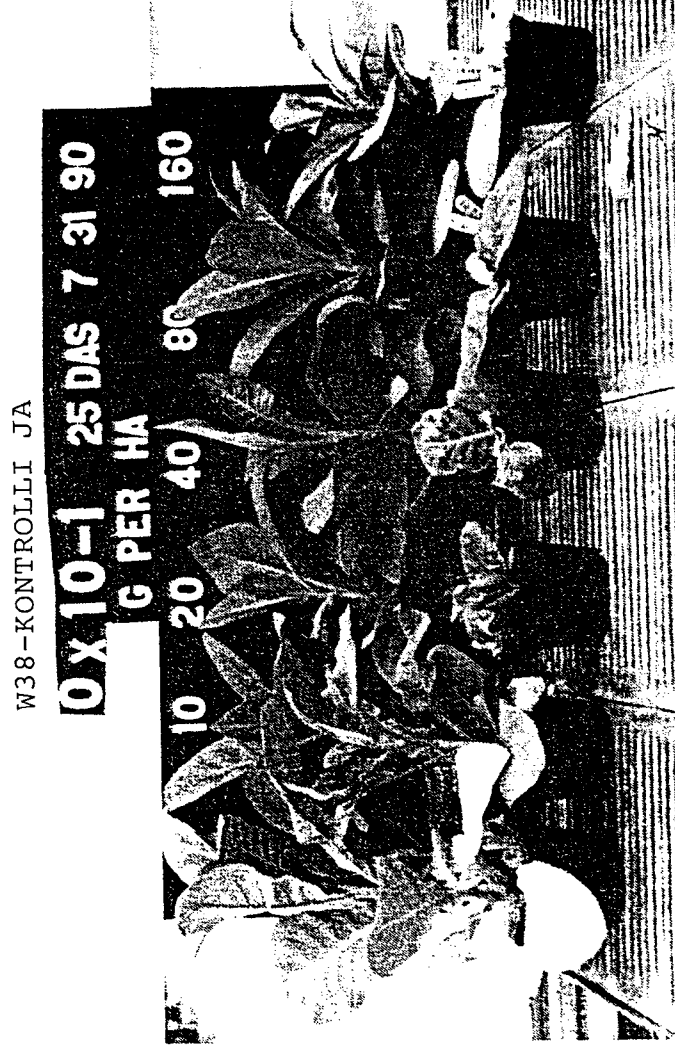


FIG.2c

W38-KONTROLLI JA



PURSUITIN VAIKUTUS TUPAKAN TAIMIEN KASVUUN (10-1 ITSE)

(C* = VILLITYYPPI; R1-KASVIT = ITSESIITETYSTÄ RO:STA SAATUJA JÄLKELÄISIÄ)

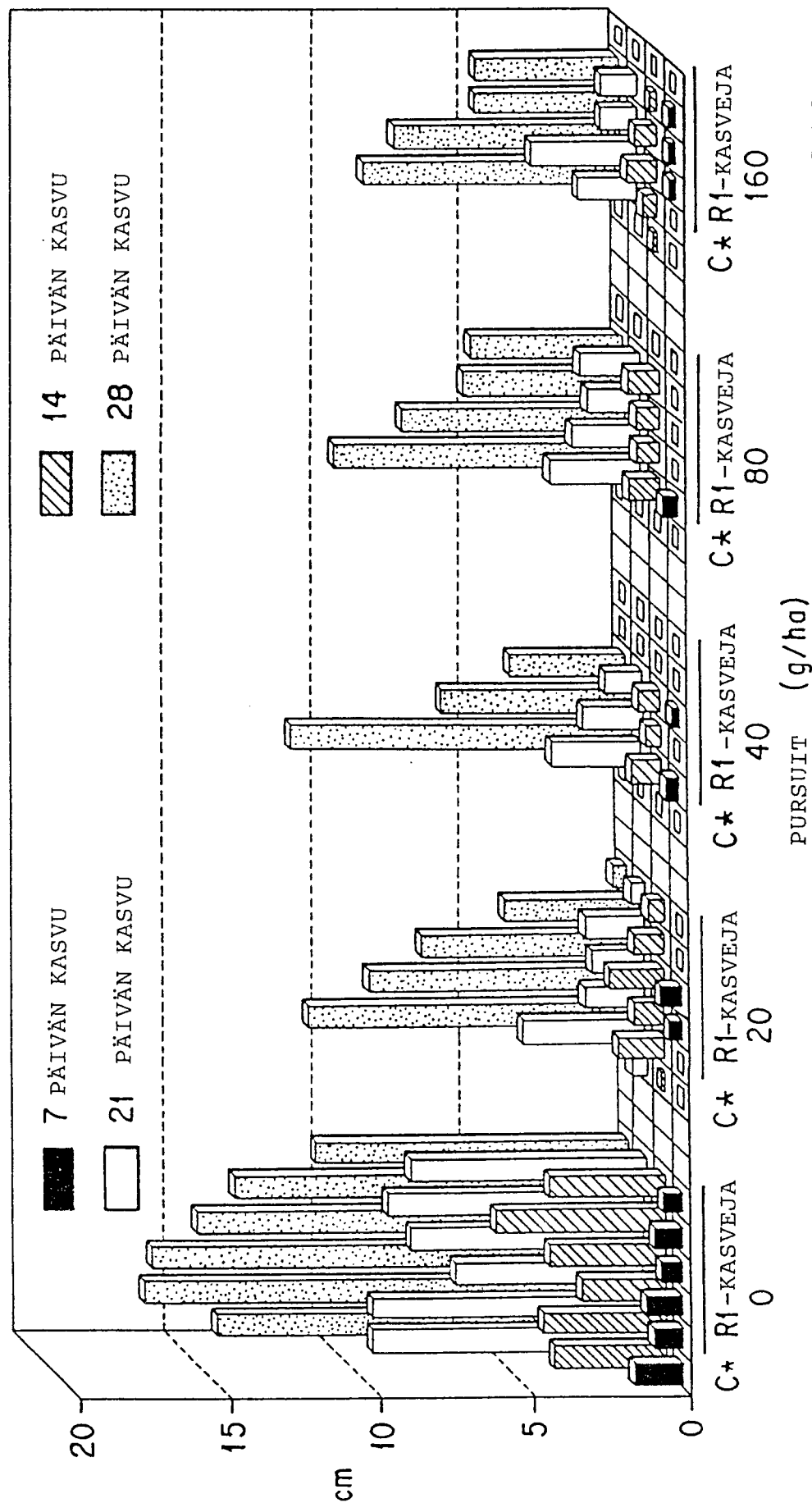


FIG. 3

Trp574-MUTANTTIEN ILMENTÄMINEN E. COLISSA

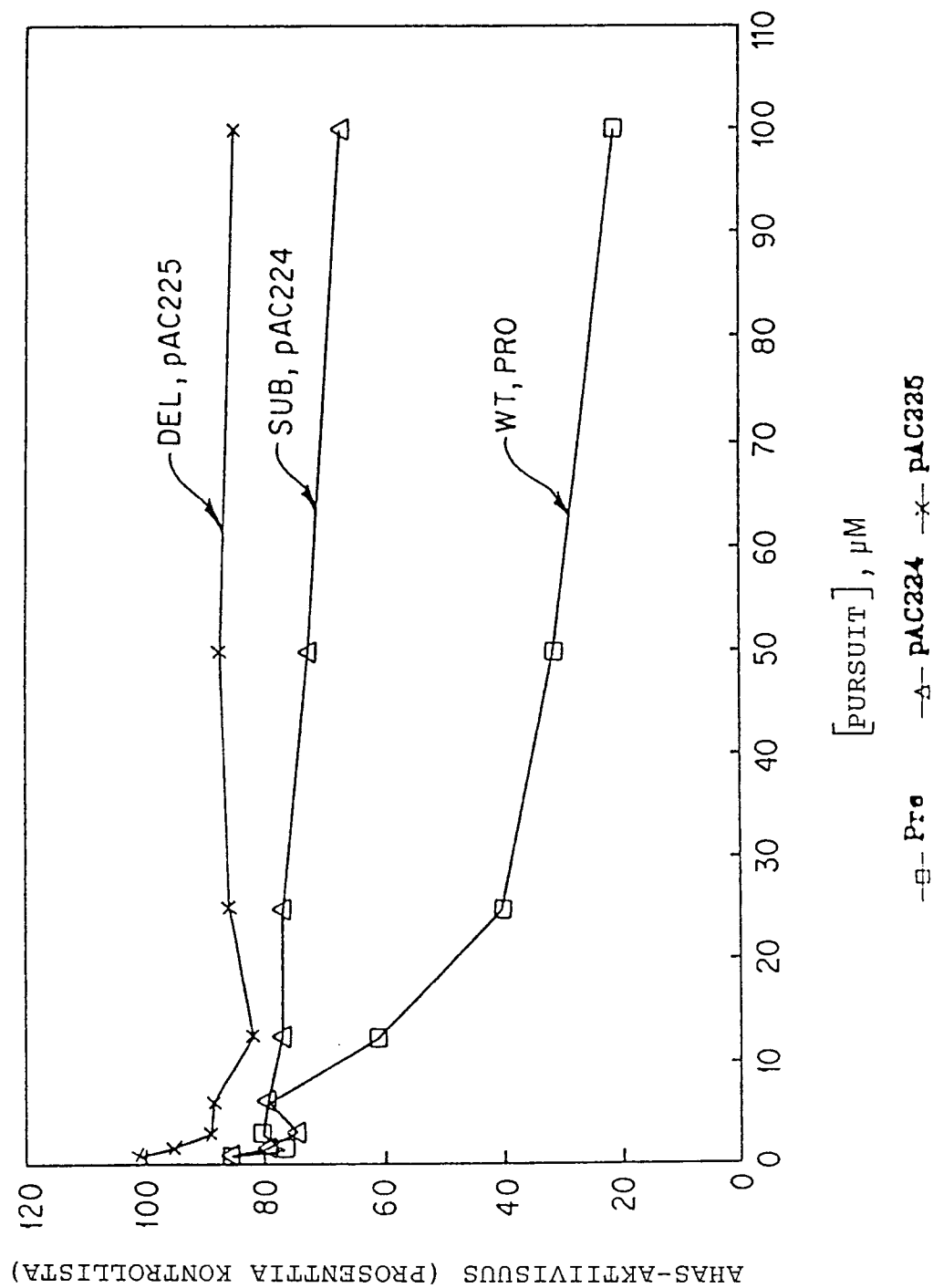


FIG. 4

TRP574-MUTANTTIEN ILMENTÄMINEN E. COLISSA

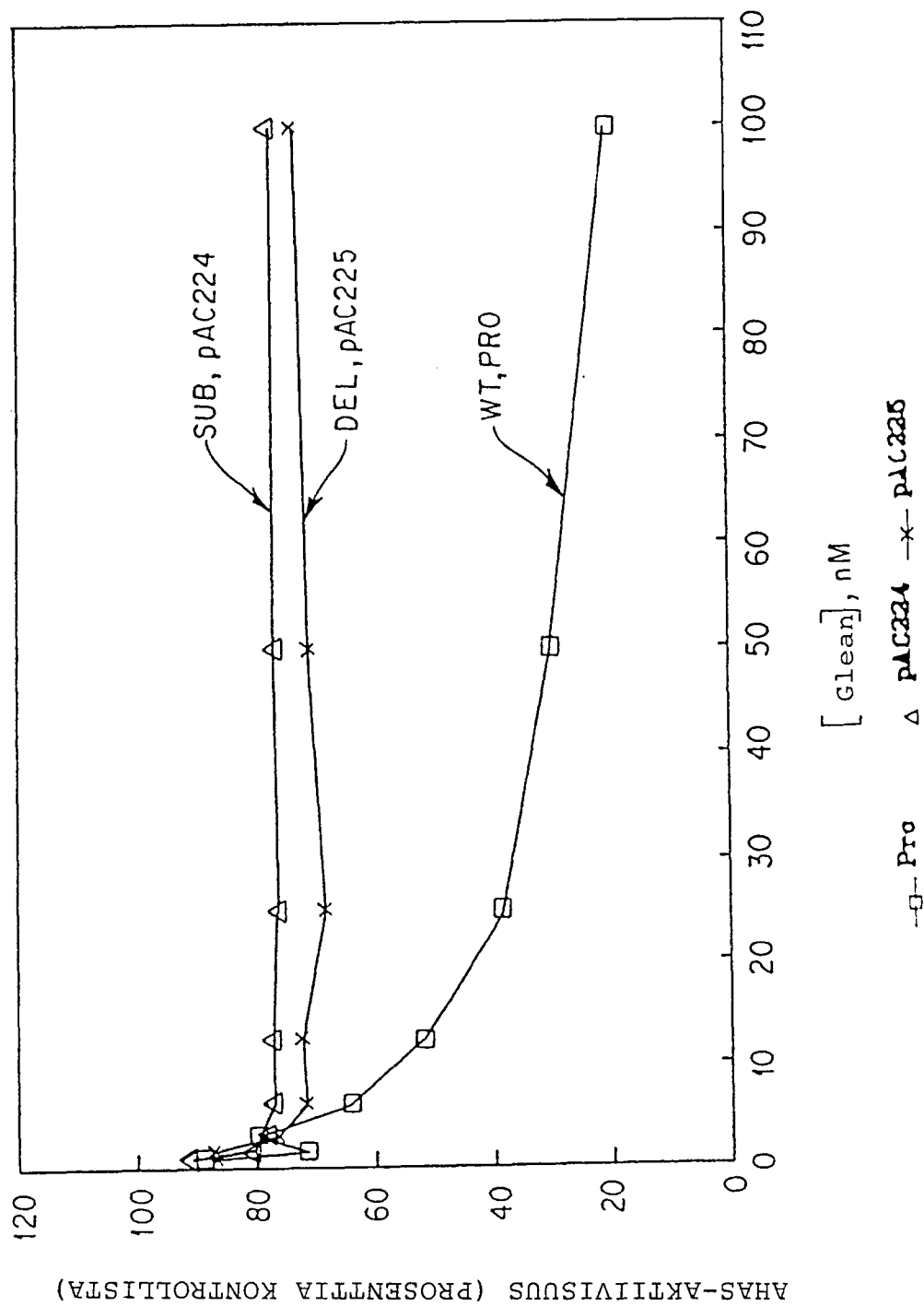


FIG. 5

SER653-MUTANTTIEN ILMENTÄMINEN E. COLISSA
KASVATETTU ANTAEN val+ile

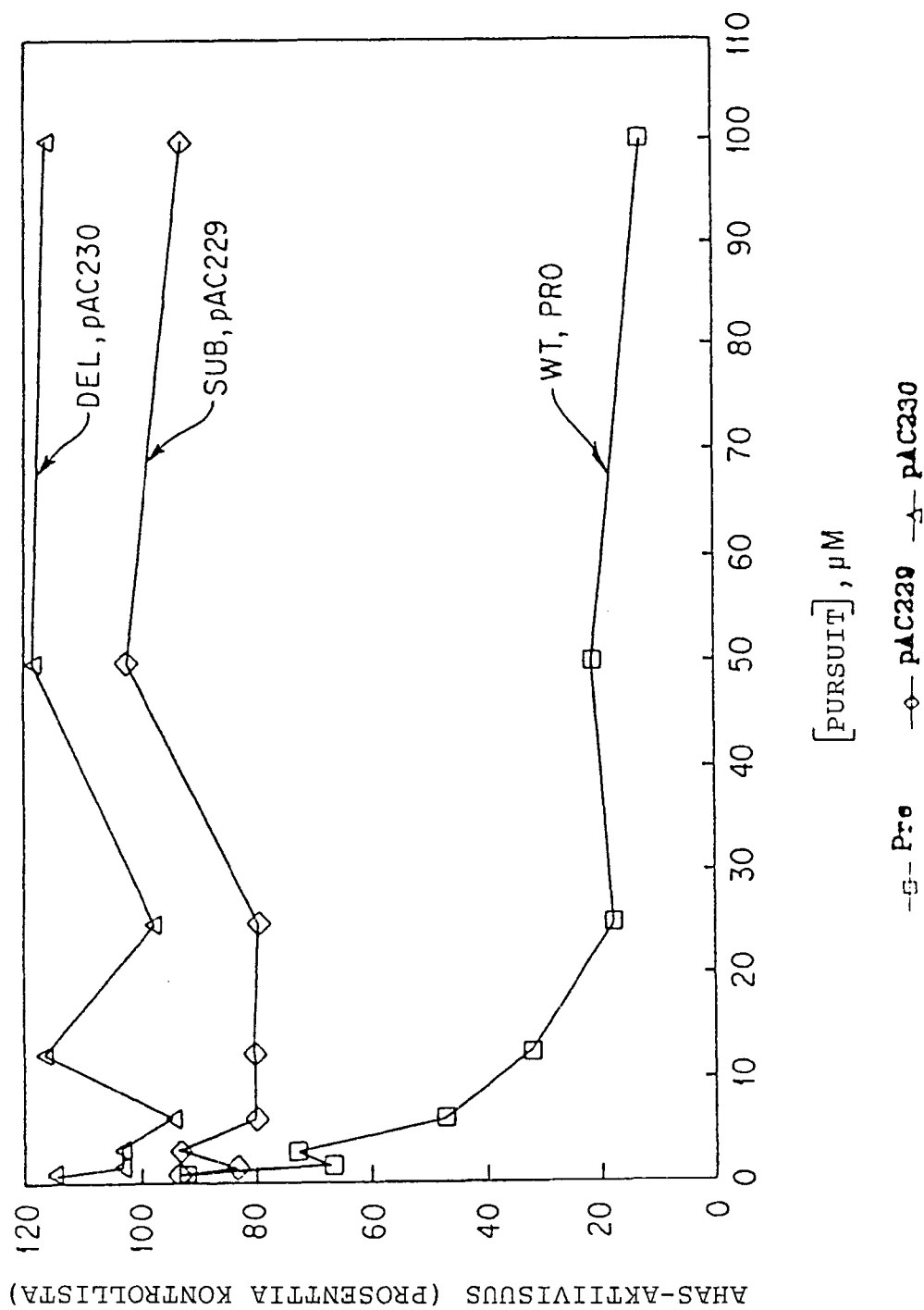


FIG. 6

SER653-MUTANTTIEN ILMENTÄMINEN E. COLISSA

KASVATETTU ANTAEN val+ile

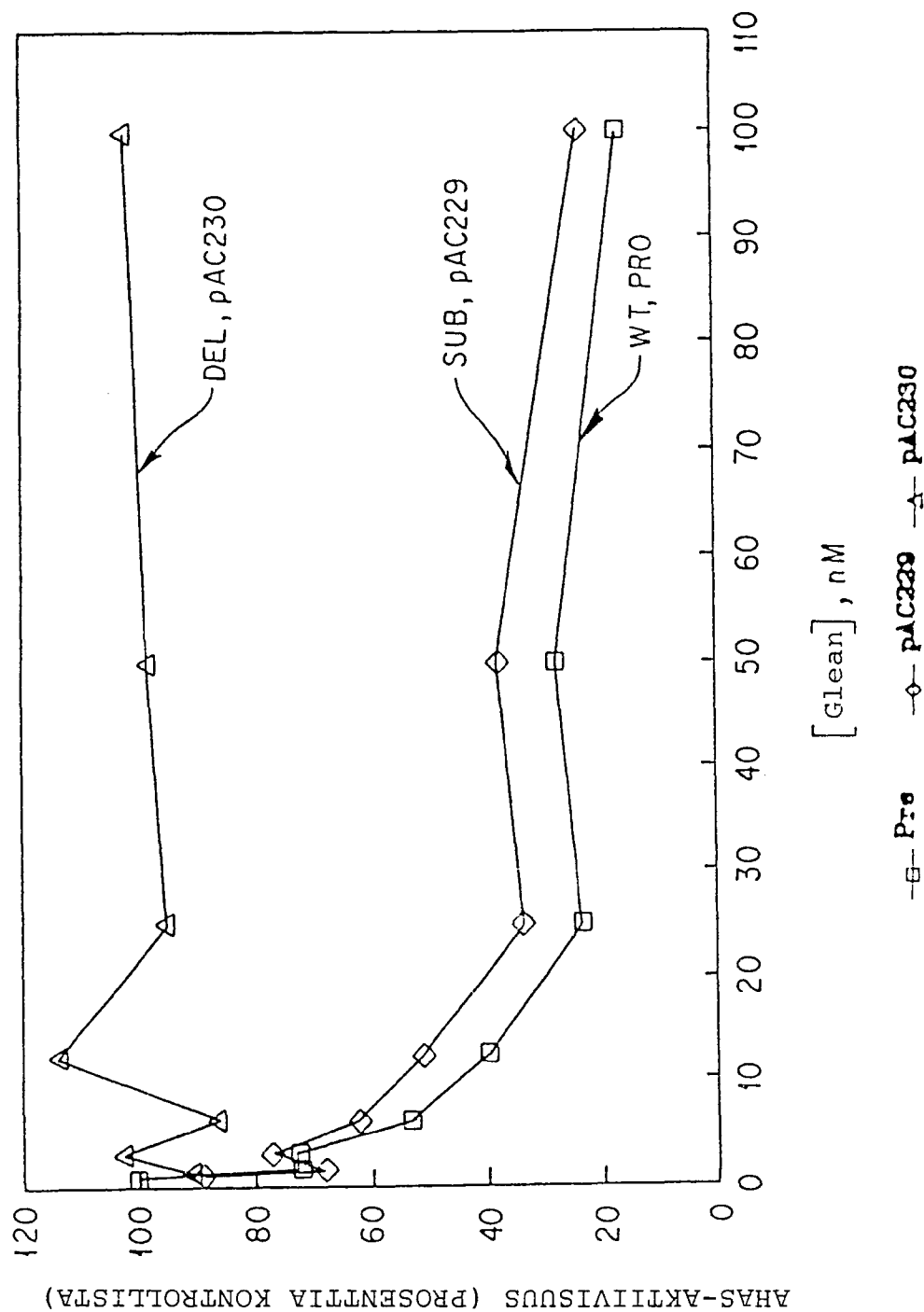


FIG. 7

TRANSGEENISESTÄ TUPAKASTA PERÄISIN OLEVA AHAS
Trp574-DELEETIOMUTANTTEJA

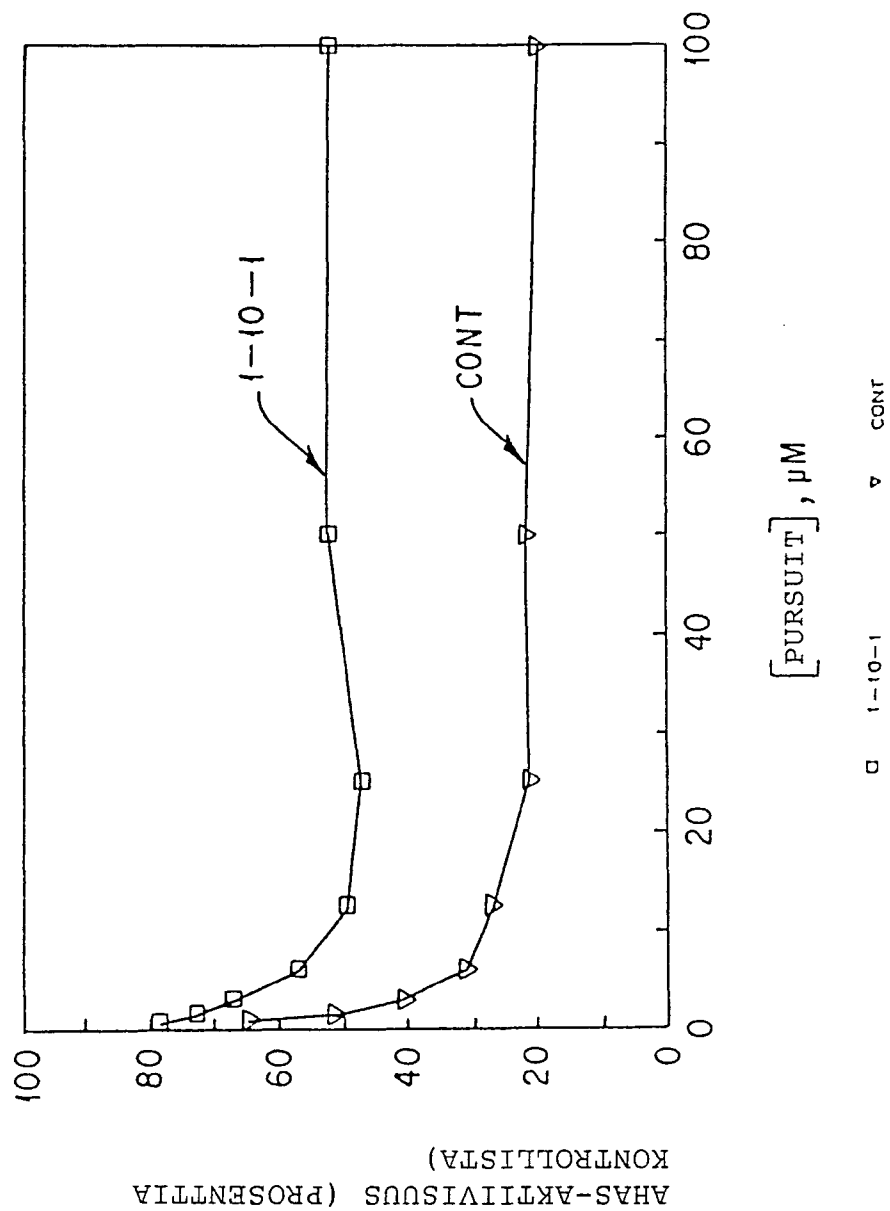


FIG. 8