(19) DANMARK (11) **DK 175922 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: **C 12 N 15/82** **A 01 H 1/00** **C 12 N 5/00** **C 12 N 15/52**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1986 03745**

(22) Indleveringsdag: **1986-08-06**

(24) Løbedag: **1986-08-06**

(41) Alm. tilgængelig: **1987-02-08**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2005-07-04**

(30) Prioritet: **1985-08-07 US 763482** **1985-10-29 US 792390** **1986-07-07 US 879814**

(73) Patenthaver: **Monsanto Technology LLC., 800 North Lindbergh Boulevard, St. Louis,MO 63167, USA**

(72) Opfinder: **Stephen Gary Rogers, 14788 Timberbluff, Chesterfield, Missouri 63017, USA**
Robert Bruce Horsch, 12316 Tempo, St. Louis, Missouri 63146, USA
Robert Thomas Fraley, 12917 Topping Estates Drive, St. Louis, Missouri 63131, USA
Dilip Maganlal Shah, 6 Nassau Circle, Creve Coeur, Missouri 63146, USA

(74) Fuldmægtig: **Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark**

(54) Benævnelse: **Glyphosat-resistente planter**

(56) Fremdragne publikationer:
Plant Physiology, vol. 80(4):127, 12/6 1986, della-Cioppa et al., "Translocation of the precurser of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase into chloroplasts of higher plants in vitro"

(57) Sammendrag:

Opfindelsen har relation til en klonings- eller udtrykkelsesvektor, der består af et gen, som koder for 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat-syntåse (EPSPS) polypeptid, som ved udtrykkelse i en plantecelle indeholder et chloroplast-transit-peptid, som tillader polypeptidet eller en enzymatisk aktiv del deraf at blive transporteret fra cytoplasma af plantecellen ind i et chloroplast i plantecellen og overfører en væsentlig grad af glyphosat-resistens til plantecellen, og planter regenereret deraf.

EPSPS-kodningssekvensen kan ligeres til en kraftig promotor, såsom 35S promotoren fra blomkålsmosaik-virus, til dannelse af et kimærisk gen. Sådanne gener kan indsættes i plantetransformationsvektorer og derefter indføres i plantecellerne. De ved anvendelse af sådanne gener transformerede planteceller og regenererede planter deraf har vist sig at udvise en væsentlig grad af glyphosat-resistens.

fortsættes

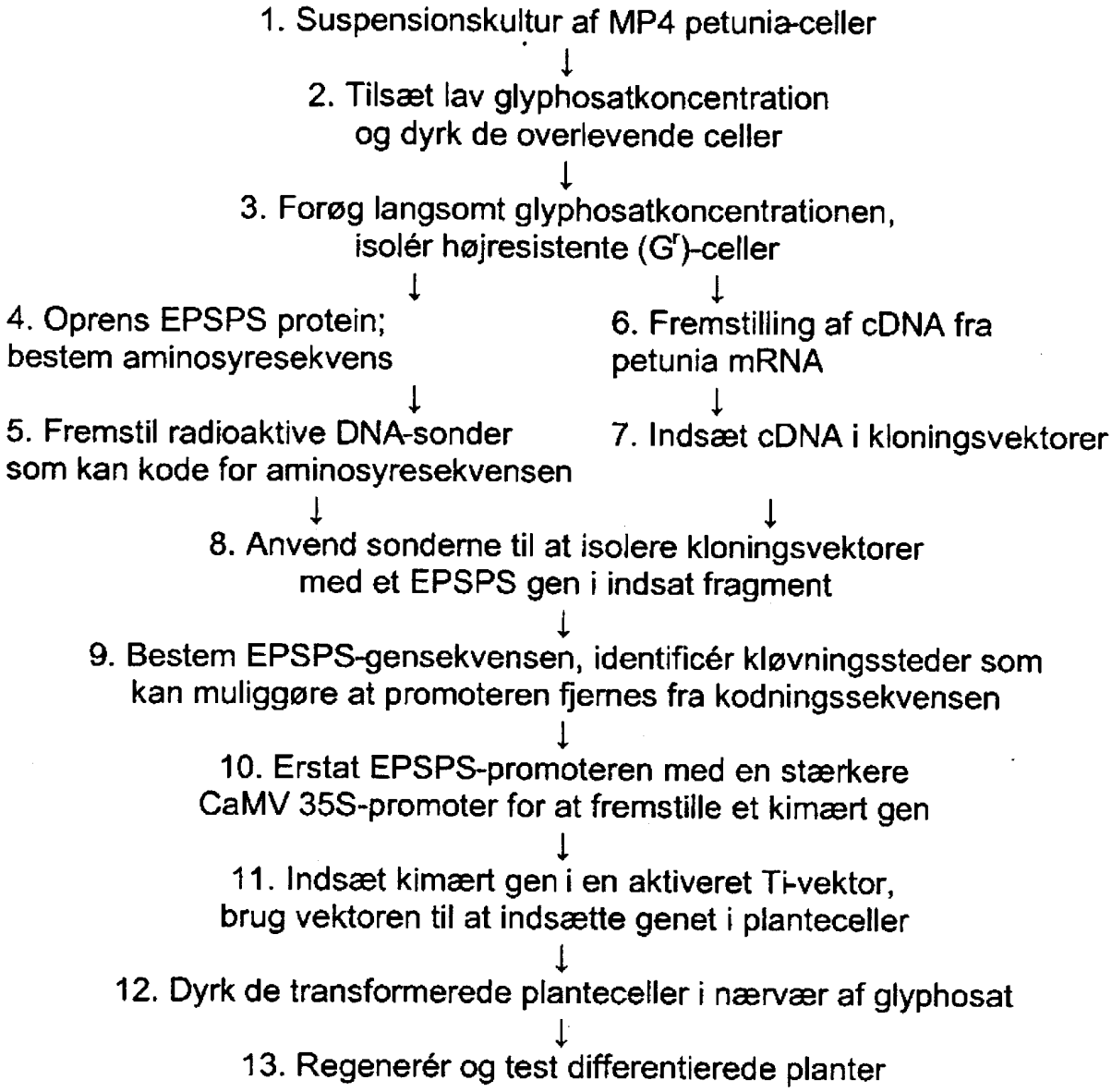
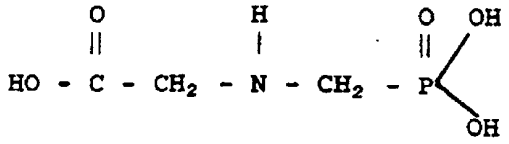

1. Suspensionskultur af MP4 petunia-celler
2. Tilsæt lav glyphosatkoncentration og dyrk de overlevende celler
3. Forøg langsomt glyphosatkoncentrationen, isolér højresistente (G^r)-celler
4. Oprens EPSPS protein; bestem aminosyresekvens
5. Fremstil radioaktive DNA-sonder som kan kode for aminosyresekvensen
6. Fremstilling af cDNA fra petunia mRNA
7. Indsæt cDNA i kloningsvektorer
8. Anvend sonderne til at isolere kloningsvektorer med et EPSPS gen i indsat fragment
9. Bestem EPSPS-gensekvensen, identificér kløvningssteder som kan muliggøre at promoteren fjernes fra kodningssekvensen
10. Erstat EPSPS-promoteren med en stærkere CaMV 35S-promoter for at fremstille et kimært gen
11. Indsæt kimært gen i en aktiveret Ti-vektor, brug vektoren til at indsætte genet i planteceller
12. Dyrk de transformerede planteceller i nærvær af glyphosat
13. Regenerér og test differentierede planter

Fig. 1

Glyphosat-resistente planter

Den foreliggende opfindelse angår en klonings- eller udtrykkelsesvektor, som ved indsætning i en plantecelle gør denne glyphosat-resistent.

N-phosphonomethylglycin har følgende strukturform:



Dette molekyle er en syre, som kan dissociere i vandige opløsninger til dannelse af phytotoxicante anioner. Flere anioniske former er kendte. I den foreliggende beskrivelse anvendes udtrykket "glyphosat" til syren og dennes anioner. En blanding indeholdende glyphosat som den aktive bestanddel foreliggende isopropylaminsaltet, forhandles som et herpicid af Monanto Company under varemærket ROUNDUP®. Flere andre salte, der ligeledes har herpicide egenskaber, er anført som eksempler i beskrivelsen til US patent nr. 3 799 758 og forskellige andre patentskrifter. Præparater indeholdende N-phosphonomethylglycin og saltdannende kationer, der forøger opløseligheden af N-phosphonomethylglycin i vand foretrækkes.

Fagmanden vil forstå, at der i videnskabelig litteratur findes talrige artikler, som foreslår flere forskellige virkningsmåder for inhibering af plantevækst med glyphosat. Ifølge en af hypoteserne foreslås, at glyphosat inhiberer et enzym, der kaldes 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat-syntase (EPSPS); se f. eks. Amrhein 1980, Steinrucken 1980-, Mousdale 1984 og Rubin 1982 (note: en komplet liste af referencer findes bagest i beskrivel sen). EPSPS-enzymet katalyserer angiveligt omdannelsen af shikimat-3-phosphat til 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat, et mellemprodukt i den biokemiske rute for dannelse af tre essentielle aromatiske aminosyret (tyrosin, phenylalanin og tryptophan);

se Mousdale 1984. Rogers 1983 rapporterer, at overproduktion af EPSPS i E. coli bidrager til glyphosat-resistens i disse celler.

Mindst én forsker har forsøgt at skabe glyphosat-resistente bakterieceller ved manipulering af et bakteriegen, der koder for EPSPS-enzym. Som beskrevet i US patentskrift nr. 4 535 060 blev en kultur af Salmonella bakterier behandlet med et mutagen (ethylmethansulfonat). Bakterierne blev screenet for glyphosat-resistens, og en forholdsvis resistent kultur blev udvalgt. Denne kultur blev analyseret, og det blev påvist, at den havde en mutant form af EPSPS med en substitueret aminosyre, rapporteret i Stalker 1985. US patent nr. 4 535 060 angiver, at mutant EPSPS-genet kunne indsættes i planteceller til dannelse af glyphosat-resistens (Gly^R) planteceller. Desuden er det rapporteret, at glyphosat-tolerante planteceller kan udvælges, som overproducerer EPSPS i nærværelse af lave koncentrationer af glyphosat (se Nafziger et al, 1984 og Smart et al, 1985). Ingen af disse forsøg har dog demonstreret, at en sådan metode ville være effektiv i differentierede planter.

Efter indleveringsdatoen for US patent nr. 4 535 060 er der beskrevet metoder og vektorer, som kunne anvendes til indføring af fremmede gener i planteceller (se f. eks. Fraley 1983, Herrera-Estrella 1983, Bevan 1983 og PCT ansøgning WO 84/02919 og 02920). I PCT ansøgning WO 84/02913 er også beskrevet metoder for tilvejebringelse af kimære gener med bakteriel EPSPS kodningssekvenser, kontrolleret ved regulatoriske sekvenser fra gener, som er aktive i planteceller. Ved anvendelse af disse vektorer og metodikken kan bakteriegener, såsom mutanten Salmonella EPSPS-genet, der er nævnt ovenfor, manipuleres og udtrykkes i planteceller.

Formålet med den foreliggende opfindelse er at tilvejebringe en metode til genetisk transformering af planteceller, som får cellerne og planterne til at blive resistente over for glyphosat og de herbicidale salte deraf.

Opfindelsen angår således en klonings- eller udtrykkelsesvektor, omfattende et gen, som koder for 5-enolpyruvinylshikimat-3-phosphat-syntase (EPSPS) polypeptid, som ved udtrykkelse i en plantecelle indeholder et chloroplast-transit-peptid tillader polypeptidet eller en enzymatisk aktiv del deraf at blive transporteret fra cytoplasma af plantecellen ind i chloroplastet i plantecellen og derved overføre en væsentlig grad af glyphosat-resistens til plantecellen og de heraf afledte planter.

EPSPS-kodningssekvensen kan ligeres til en kraftig promotor, såsom 35S-promotor fra blomkålsmosaikvirus, til dannelse af et kimærisk gen. Sådanne gener kan indsættes i plantetransformationsvektorer og derefter indføres i plantecellerne. De transformerede planteceller, som indeholder sådanne gener, og de deraf udviklede planter har vist sig at udvise en væsentlig grad af glyphosat-resistens.

Den foreliggende opfindelse angår et kimærisk gen, som indeholder en EPSPS-kodende sekvens, en klonings- eller ekspressionsvektor, som indeholder et EPSPS-kodende gen, planteceller transformeret med en sådan vektor og deraf udviklede planter, som udviser en væsentlig grad af glyphast-resistens, samt fremgangsmåder til at fremstille sådanne planteceller og sådanne planter.

Opfindelsen skal i det efterfølgende illustreres nærmere under henvisning til tegningen, hvor

fig. 1 er et procesdiagram for opfindelsens udøvelse,

fig. 2 illustrerer dannelsen af plasmid pMON546, en plantetransformations-vektor, som indeholder et kimærisk CaMV/EPSPS-gen; endvidere angives strukturen af pGV3111-SE, et reduceret Ti-plasmid med vir-gener, som modvirker til indsætning af CaMV/EPSPS-gen fra pMON546 i plantekromosomer,

fig. 3 angiver DNA-sekvensen, og aminosyre-sekvensen af chloroplast-transit-peptidet fra petunia EPSPS-genet og enzym,

fig. 4 viser nucleotidet, aminosyre-sekvensen og restriktionskort for den fulde længde af cDNA af petunia EPSPS,

fig. 5 viser plasmidkortet for pMON316,

fig. 6 viser restriktionskortet for EPSPS-genet af Petunia og Arabidopsis, og

fig. 7 viser plasmidkortet for pMON9721.

Opfindelsen angår som nævnt en klonings- eller udtrykkelsesvektor omfattende et gen, der koder for en form af EPSPS, som effektivt overfører glyphosat-resistens (GlyR) til planteceller og heraf udviklede planter. EPSPS-genet koder for et polypeptid, der indeholder et chloroplast-transit-peptid (CTP), som gør det muligt for EPSPS-polypeptidet (eller en aktiv del deraf) at overføres til et chloroplast inde i plantecellen. Eksempler på egnede planter, som kan behandles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er soyabønne, bomuld, alfalfa, canola, hør, tomater, sukkerroer, solsikker, kartofler, tobaksplanter, majs, hvede, ris og salat.

Det vil forstås, at der i den videnskabelige litteratur findes talrige artikler, som angiver, at EPSPS-aktivitet (shikiminsyre-ruten) findes både i chloroplastet og i cytoplastma. Det har hidtil ikke været kendt, hvorvidt det klonede EPSPS skulle findes i cytoplasma eller i chloroplaster for at opnå glyphosat-resistens. I modsætning til den lære, som kan udledes af US patentskrift nr. 4 535 060 har det nu vist sig, at EPSPS-genet skal indeholde et chloroplast-transit-peptid. Medens chloroplaster indeholder DNA, som formodes at udtrykkes i polypeptider inde i chloroplastet, bliver EPSPS-polypeptidet kodet af kromo-

somal DNA i stedet for chloroplast-DNA. EPSPS-genet transskriberes i mRNA i kernen, og mRNA translateres til et præcursor-polypeptid (CTP/modent EPSPS) i cytoplasmaet. Præcursor-polypeptidet (eller en del deraf) transporteres til chloroplastet.I én udførelsesform angår opfindelsen et kimærisk plantegen, som omfatter:

(a) en promotersekvens, som forårsager transkription af EPSPS-genet i planteceller;

(b) en kodende sekvens, som koder for chloroplast transit peptid/5-enolpyruvylshikimate-3-phosphat-syntase-fusionspolypepid, hvilken chloroplast-transit peptid, ved udtrykkelse i en plantecelle, tillader fusions-polypeptidet eller en enzymatisk aktiv del deraf at importere polypeptidet i en chloroplast af cellen; og

(c) en 3' utranslateret region, som koder for et polyadenyleringssignal, der i planteceller fungerer ved at forårsage tilføjelse af polyadenylatnucleotider til 3'-enden af EPSPS mRNA; promotoren er heterolog i forhold til kodningssekvensen og i stand til at forårsage tilstrækkelig udtrykkelse af fusions-polypeptidet til at deraf udviklede planter og planteceller opnår en tilstrækkelig grad af glyphosat-resistans.

Promotorer, der vides at kunne forårsage transskription af EPSPS-genet i planteceller, kan anvendes ved den foreliggende opfindelse. Sådanne promotorer kan fås fra planter eller vira og omfatter, men er ikke nødvendigvis begrænset til, 35S og 19S promotorer fra blomkålsmosaikvirus og promotorer isoleret fra planteceller, såsom EPSPS, ssRUBISCO-gener og promotorer opnået fra T-DNA-gener af Agrobacterium tumefaciens, såsom nopalin og mannopin-syntase. Den særlige promotor, der udvælges, må være i stand til at forårsage tilstrækkelig udtrykkelse til produktion af en effektiv mængde af EPSPS-polypeptid for at gøre plantecellerne og de heraf udviklede planter i væsentlig grad resistente overfor glyphosat. Fagmanden vil forstå, at mængden af EPSPS-polypeptid, der behøves til at indføre resistens, kan variere med plantetypen. Den nødvendige udtrykkelsesgrad kan variere med den an-

vendte EPSPS-kodningssekvens. En mutant EPSPS kan kræve en mindre udtrykkelse end en mindre tolerant vildtype EPSPS-sekvens.

CaMV 35S-promotoren er kraftigere end den naturlige EPSPS-promotor, i det mindste i nogle plantetyper, dvs. forårsager dannelsen af større mængder mRNA fra kimæriske gener, sammenlignet med den naturlige EPSPS-promotor. Den højere styrke af kimærisk CaMV 35S/EPSPS-gen er af stor værdi ved anvendelse af EPSPS-genet som en selekterbar markør i laboratoriemålestok. Når et kimærisk gen anvendes til at transformere regenererede planter til fødeproduktion, kan mængden af produktion af EPSPS-enzymet imidlertid være uønsket høj, fordi nucleotider, aminosyrer og substrater ledes bort fra andre ønskede biokemiske ruter i cellen. For at skabe et kimærisk gen med optimal niveau for udtrykkelse af EPSPS kan det derfor være ønskeligt at formindske styrken af det kimæriske CaMV 35S/EPSPS-gen. Dette kan gøres ved forskellige metoder, såsom (1) tilfældig eller sæde-specifik mutagenese af området forud for transskription-startsstedet, (2) indsætning af en transskriptionsterminator i 5'-ikke-translateret område af genet, (3) indsætning af et falsk startkodon foran EPSPS-startkodon, eller (4) indsætning af en kodningssekvens med et startkodon og et startkodon foran EPSPS-startkodonet, for derved at skabe en dicistronisk kodningssekvens.

Promotorerne, der anvendes i EPSPS-generne ifølge opfindelsen kan om ønsket yderligere modificere til ændring af deres udtrykkelsesegenskaber. For eksempel kan CaMV 35S-promotoren ligeres til proteinet af ssRUBISCO-genet som undertrykker udtrykkelsen af ssRUBISCO i fravær af lys for derved at skabe en promotor, som er aktiv i bladene, men ikke i rødderne. Den resulterende kimæriske promotor kan anvendes som beskrevet i det efterfølgende. Udtrykket "CaMV 35S"-promotoren omfatter variationer af CaMV 35S-promotoren, f. eks. promotorer dannet ved ligering med operator-regioner, tilfældig eller kontrolleret mutagenese etc.

Det af EPSPS-genet dannede RNA indeholder også en 5'-ikke-tranlateret styre-sekvens. Denne sekvens kan afledes fra et vilkårligt gen og kan specifikt modificeres således, at translationen af mRNA forøges. De 5'-ikke-translaterede regioner kan afledes af viral RNA, andre egnede eukaryotiske gener eller en syntetisk gensekvens. Den kan være en del af 5'-enden af den ikke-translaterede region af kodningssekvensen for EPSPS-polypeptidet eller afledt af en ikke-relateret promotor eller kodningssekvens som omtalt i det efterfølgende.

EPSPS-genet ifølge opfindelsen koder for et CTP/EPSPS-fusionspolypeptid. Efter at CTP/EPSPS-polypeptidet fra et gen ifølge opfindelsen er translateret fra mRNA i cytoplasmaet af den transformerede plantecelle, antages det at kunne behandles på samme måde som naturligt EPSPS-polypeptid. CTP-styresekvensen får polypeptidet til at trænge ind i chloroplastet, og CTP-styresekvensen, som er kodet af det plante-afledte EPSPS-gen, antages at blive fjernet fra resten af polypeptidet, således at en aktiv del af EPSPS-polypeptidet eksisterer og fungerer inde i chloroplastet.

Egnede CTP'er til anvendelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan fås fra forskellige kilder. Det foretrækkes især at udvinde CTP fra det endogene EPSPS-gen af den pågældende plante, som skal transformeres. I stedet kan man ofte anvende CTP fra et EPSPS-gen fra en anden plante. Selv om der er ringe homologi mellem CTP-sekvenserne af EPSPS-genet og ssRUBISCO-genet (se f. eks. Broglie fra 1983), kan man finde, at ikke-homologe CTP'er kan fungere i særlige udførelsesformer. Egnede CTP-sekvenser til anvendelse ifølge opfindelsen kan let bestemmes ved at undersøge chloroplast-optagningen af et EPSPS-polypeptid, omfattende det aktuelle CTP, som beskrevet i efterfølgende eksempel 18.

Sekvensen, der koder for et EPSPS-polypeptid, kan fås fra talrige kilder. Egnede kilder omfatter bakterier, svampe og planter. EPSPS-

kodningssekvensen fra andre kilder kan opnås under anvendelse af cDNA i fuld længde fra Petunia (se fig. 4) eller et egnet fragment deraf som en hybridiserings-sonde som beskrevet i eksemplerne 1 og 14-17.

Alle peptidstrukturer, som er omtalt i den foreliggende beskrivelse, er vist i konventionelt format, hvor aminogruppen ved N-terminus er anbragt til venster og carboxylgruppen ved C-terminus til højre. Endvidere er aminosyre-nomenklaturen for de naturligt forekommende aminosyrer i proteiner følgende: alanin (Ala;A), asparagin (Asn;N), aspartinsyre (Asp;D), arginin (Arg;R), cystein (Cys;C), glutaminsyre (Glu;E), glutamin (Gln;Q), glycin (Gly;G), histidin (His;H), isoleucin (Ile;I), leucin (Leu;L), lysin (Lys;K), methionin (Met;M), phenylalanin (Phe;F), prolin (Pro;P), serin (ser;S), threonin (Thr;T), tryptophan (Trp;W), tyrosin (Tyr;Y) og valin (Val;V).

Det vil forstås, at mutanter og varianter af EPSPS kan fremstilles ved forskellige processer. For eksempel kan klonings- eller ekspressionsvektorer mutageniseres til ændring af én eller flere aminosyrerester i et EPSPS-protein. Dette kan udføres i form af tilfældige mutationer (f. eks. ved at underkaste værtcellerne behandling med mutagene midler, såsom røntgenstråler, ultraviolet lys eller forskellige kemikalier) eller ved en nøjagtigt forudsigelig substitution af baser i DNA-sekvensen. I stedet kan man udvælge en mikrobiel kilde, såsom bakterier og svampe, eller en plantekilde med en mutant EPSPS-, der udviser forøget resistens overfor glyphosat.

Den 3'-ikke-translaterede region indeholder et polyadenyleringssignal, der fungerer i planter til at fremkalde addition af polyadenylatnucleotider til 3'-enden af EPSPS mRNA. I tilfælde hvor EPSPS-sekvensen er afledt fra en plantekilde, kan man anvende den 3'-ikke-translaterede region, som naturligt er associeret med det særlige EPSPS-gen. Eksempler på andre egnede 3'-regioner er 3'-transskriberede ikke-translaterede regioner indeholdende polyadenylation signalet af nopalinsyntase (NOS) genet af det Agrobacterium

tumor-inducerende (Ti) plasmid eller conglycinin (7S) lager-proteingenet.

EPSPS-genet ifølge den foreliggende opfindelse indsættes i genomen af en plante på passende måde. Egnede plantetransformationsvektorer omfatter de, der er afledt af Ti-plasmidet af Agrobacterium tumefaciens samt de i f. eks. Herrera-Estrella 1983, Bevan 1983, Klee 1985 og EPO publikation 120 516 (Schilperoort et al.) beskrevne. Udover plantetransformationsvektorer, der er afledt af Ti eller rodinducerende (Ri) plasmider af Agrobacterium, kan alternative metoder anvendes til indsætning af EPSPS-generne ifølge opfindelsen i plantecellerne. Sådanne metoder kan f. eks. omfatte liposomer, elektroporation, kemikalier, der forøger den frie DNa-optagning, og anvendelsen af virus eller pollen som vektorer. Om ønsket kan flere end et EPSPS-gen indsættes i kromosomerne af en plante ved metoder, såsom repetering af transformation og selektion-cyclen mere end en gang.

EPSPS-generne, der koder for et enzym med et funktionelt chloroplast-transit-peptid, (som fortrinsvis fjernes fra det modne EPSPS-polypeptid) udgør også værdifulde selekterbare markør-gener for plantecelletransformation, når transformerede og utransformerede celler bringes i kontakt med passende koncentrationer af glyphosat (som rutinemæssigt kan bestemmes for enhver plantetype). Det sammenlignelige træk af glyphosat-resistens kan være særlig værdifuld ved visse plantetyper (såsom alfalfa, soyabønne og andre grøntsager), som ikke udviser klar selekterbarhed ved anvendelse af andre selekterbare markør-gener (såsom kanamycin, methotrexat eller hygromycin-resistente gener).

Desuden kan glyphosat-resistens planteceller, som er blevet transformeret med EPSPS-gener, regenereres i differentierede planter under anvendelse af standardnæringsmidler, som tilføres ved selekteret spire-inducerede eller rodinducerede hormoner under anvendelse af de i beskrivelsen til PCT WO84/02920 beskrevne metoder eller andre i og for sig kendte metoder.

Anvendt som beskrevet i det efterfølgende vil EPSPS-genet fremkalde en væsentlig grad af glyphosat-resistens til en plantecelle, hvis en væsentlig fraktion af en afgrøde af transformeret planteceller overlever en koncentration af glyphosat, som dræber i det væsentlige alle ikke-transformerede celler af samme plantetype under samme betingelser.

Udtrykket "klonings- eller ekspressions-vektor" refererer til DNA eller RNA-molekyle, som er i stand til at replicere i en eller flere typer mikrobielle celler. Vektorer omfatter plasmider, kosmider, viral DNA eller RNA, minikromosomer etc.

Udtrykket "repliceret fra" omfatter indirekte replikation (dvs. replikation af intermediære vektorer) samt replikation direkte fra plante-DNA eller -mRNA. Det omsætter også DNA, som er syntetiseret (f. eks. ved en af Adams i 1983 beskrevne metode) under anvendelse af en sekvens af baser, som er publiceret eller bestemt eksperimentiel.

Udtrykket "fusions-polypeptid" omfatter konstruktioner, hvori chloroplasttransit-peptidsekvensen er forbundet med et nativt 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat-syntasegen (EPSPS), eller hvori chloroplast-transit-peptidsekvensen er forbundet med et heterologt EPSPS-gen.

Opfindelsen skal i det efterfølgende illustreres nærmere ved hjælp af nogle udførelseseksempler.

Eksempel 1

Dannelse af EPSPS-vektorer

A. Dannelse af MP4-G cellelinien

Udgangscellelinien, betegnet MP4-linien var afledt af Mitchell diploid petunia (se f. eks. Ausubel 1980). MP4-cellerne blev suspenderet i Murashige og Skoog (MS) dyrkningsmedium, (GIBCO, Grand Island, N. Y.). Alle overførsler sker i form af 10 ml suspensionskulturer i 50 ml frisk medium. Dyrkningsperioderne indtil næste næste overførsel udgjorde fra 10 til 14 dage og var baseret på visuel indikationer, som viste, at kulturen nærmer sig mætning.

Tilnærmelsesvis 10 ml af en mættet suspensionskultur (indeholdende 5 x 106 celler blev overført i 50 ml MS medium indeholdende 0,5 mM glyphosat (Monsanto Agric. Products Co., St. Louis, Missouri)). Natriumsaltet af glyphosat blev anvendt ved alle de her beskrevne forsøg. Den største majoritet af celler var ude af stand til at reproducere i nærværelse af glyphosatet. De overlevende celler (bedømt til at være mindre end 1% af udgangspopulationen) blev dyrket i 0,5 mM glyphosat og overført til friske media indeholdende glyphosat hver 10. til 14. dag.

Efter to overførsler blev de overlevende celler overført i frisk medium indeholdende 1,0 mM glyphosat. Efter to overførsler ved 1,0 mM blev de overlevende celler overført sekventielt i 2,5 mM glyphosat, 5,0 mM glyphosat og 10 mM glyphosat.

MP4-G cellerne viste sig derefter (ved hjælp af en Southern blotning) at have ca. 15-20 kopier af EPSPS-genet som følge af en genetisk proces kaldet "gen-amplifikation" (se f. eks. Schimke 1982). Selv om spontan mutation kunne have fundet sted under replikationen af enhver celle, er der ingen indikation for nogen mutation eller andre modifikationer af EPSPS-genet, som kunne finde sted under gen-amplifikationsprocessen. Den eneste kendte forskel mellem MP4 og MP4-G celler er, at MP4-G cellerne indeholder multiple kopier af et EPSPS-gen og muligvis andre gener, beliggende nær ved på kromosomerne af cellerne.

B. Rensning og sekventiering af EPSPS-enzym

Petunia-celler fra MP4-G cellelinier indhøstedes ved vakuumfiltrering, blev frosset i flydende N2 og formalet til et pulver i en Waring-blander. Pulveret blev suspenderet i 0,2 M Tris-HCl, pH = 7,8, indeholdende 1 mM EDTA og 7,5% w/v polyvinyl-polypyrrolidon. Suspensionen blev centrifugeret ved ca. 20000 G i 10 minutter til fjernelse af celle-debris. Nucleinsyren blev udskilt af den ovenstående væske ved tilsætning af 0,1 rumfang 1,4% pro protaminsulfat og blev bortkastet.

Den rå proteinsuspension blev renset ved 5 trin i rækkefølge (se Mousdale 1984 og Steinrucken 1985) omfattende følgende: (1) ammoniumsulfatfældning, (2) diethylaminoethylcelluloseion-bytter-chromatografi, (3) hydroxyapatit-chromatografi, (4) påføring på en phenylagarosegel og (5) påføring på en sephacryl S-200 gel.

Det rensede EPSPS-polypeptid blev nedbrudt i en række enkelte aminosyrer ved Edman-nedbrydning ved hjælp af en model 470A protein-sekvenser (leveret af Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) ved en af Hunkapiller 1983a beskrevet metode. Hvert aminosyrederivat blev analyseret ved væskechromatografi af typen reverse phase high performance som beskrevet af Hunkapiller 1983b, ved hjælp af en cyanopropylkolonne med mere end 22000 teoretiske bunde (IBM Instruments, Wallingford CT). Aminosyresammensætningen for petunia EPSPS er kendt og fremgår af følgende tabel 1.

Tabel 1

Petunia EPSPS-sekvens

	8	9	10	11	12	13

Aminosyre:	Gln	Pro	Ile	Lys	Glu	Ile
mRNA-streng:	5'-CAP	CNN	AUU	GAP	CAP	AUU
			C			C
			A			A
Komplementær DNA-streng:	3'-GTQ	GGN	TAA	TTQ	CTQ	TAA
			G			G
			U			U
Syntetisk DNA prober:						
EPSPS1:	3'-GTQ	GGP	TAP	TTQ	CTQ	TA
EPSPS2:	3'-GTQ	GGQ	TAP	TTQ	CTQ	TA
EPSPS3:	3'-GTQ	GGN	TAT	TTQ	CTQ	TA
Nøjagtig mRNA-sekvens	5'-CCA	CCC	AUU	AAA	GAG	AUU

C. Syntese af prober

Ud fra den genetiske kode blev den i tabel 1 angivne aminosyresekvens benyttet til at bestemme de mulige DNA-kodoner, som er i stand til at kode for hver af de angivne aminosyrer. Ved at benytte denne information blev der skabt tre forskellige probe-blandinger, betegnet EPSP-1, EPSP-2 og EPSP3 som vist i tabel 1. I denne tabel repræsenterer A, T, U, C og G henholdsvis nucleotidbaserne: adenin, thymin, uracil, cytosin og guanin. Bogstaverne P, Q og N er variable, N repræsenterer en vilkårlig af baserne, P repræsenterer puriner (A eller G), Q repræsenterer pyrimidiner (U, T eller C).

Alle oligonucleotiderne blev syntetiseret ved fremgangsmåden ifølge Adams 1983. Når en intermediær nucleotidposition (P, Q eller N) blev nået, blev en blanding af de pågældende nucleotider tilsat til reaktionsblandingen. Prober blev mærket 20 pmol på et tidspunkt kort før anvendelsen med 100 µCi γ-[^{32}P]-ATP (Amersham) og 10 enheder polynucleotid-kinase i 50 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 0,1 mM EDTA og 0,1 mM spermidin. Efter inkubation i 1 time ved 37 °C, blev proberne genrenset enten på en

20% acrylamid, 8 M urinstofgel eller ved passage over en 5 ml kolonne af Sephadex G25 i 0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 1 mM EDTA.

D. Fremstilling af mRNA og præliminær testning af prober

(a) Poly-A mRNA

Total RNA blev isoleret fra MP4 (glyphosat-sensitiv) og MP4-G (glyphosat-resistens) cellelinier som beskrevet af Goldberg 1981. Total RNA blev yderligere sedimenteret gennem et CsCl-filter som beskrevet af Depicker 1982. Poly-A mRNA blev udskilt ved oligo-dT-cellulose-chromatografi. Udbyttet af poly-A RNA var 1,1 mikrogram (µg) pr. gram af MP4 celler og 2,5 µg/g MP4-G celler.

(b) Gel-behandling af RNA

Ti µg poly-A RNA fra MP4 eller MP4-G cellelinier blev udfældet med ethanol og resuspenderet i 1 x MOPS puffer (20 mM morpholinopropansulfonsyre, pH = 7,0, 5 mM natriumacetat og 1 mM EDTA, pH = 8,0) indeholdende 50% formamid og 2,2 M formaldehyd. RNA blev denatureret ved op varmning til 65 °C i 10 minutter. En femtedel rumfang af en opfyldningspuffer indeholdende 50% glycerol, 1 mM EDTA, 0,4% bromphenolblåt og 0,4% xylencyanol blev tilsat. RNA blev fraktioneret på 1,3% agarosegel indeholdende 1,1 M formaldehyd, indtil bromphenolblåt var nået næsten til bunden. HaeIII-omsat φX174 DNA, mærket med ^{32}P kørtes som påføring. DNA-markørerne angår tilnærmelsesvis overtræk for RNA-bånd.

(c) Overførsel af RNA til nitrocellulose

RNA blev overført til nitrocellulose (#BA85, Schleicher & Schuell, Keene, NH) ved blotning af gelerne i 18 timer med 20X SSC (1X SSC er 0,15 M NaCl,

0,015 M natriumcitrat, pH = 7,0om som transferpuffer. Efter overførsel blev filtrene lufttørret og bagt i en vakuumovn i 2 - 3 timer ved 80 °C.

(d) Preliminær hybridisation med radioaktive prober

Filtre blev forhybridiseret i 6 x SSC, 10 x Denhardt's opløsning (1 x Denhardt's opløsning er 0,02% ficoll, 0,02% polyvinylpyrrolidon, 0,02% oksesserumalbumin), 0,5% NP-40 og 200 µg/ml E. coli transfer-RNA ved 50 °C i 4 timer. Hybridiseringen blev udført i den friske opløsning indeholdende 2 x 10^6 cpm/ml af enten EPSP-1 eller EPSP-2 probe i 48 timer ved 32 °C. EPSP-3 proben blev ikke testet, da den indholdt en kodon (ATA), som sjældent anvendes i petuniagenomet. Hybridisationstemperaturen (32 °C), der anvendtes i hvert tilfælde, var 10 °C under dissociationstemperaturen (Td), beregnet for oligonucleotidet med lavest GC-indhold i en blanding. Td af proben blev approximeret efter formlen 2 °C x (A + T) + 4 °C (G + C).

(e) Filtervask

Filtrene blev vasket to gange i 15 - 20 minutter ved stuetemperatur i 6 x SSC og derefter 5 minutter ved 37 °C under svag rystning. Filtrene blev derefter pakket ind i plastfolie og autoradiograferet i 12 - 14 timer ved -70 °C med to intensiferende screeninger. Filtrene blev derpå atter vasket i 5 minutter under forsigtig rystning ved en temperatur 5 °C højere end forudanvendt. Filtrene blev autoradiograferet igen i 12 - 14 timer. Autoradiograferne angav, at proben ESPS-1 hybridiserede til RNA med tilnærmelsesvis 1,9 kb i rækken indeholdende poly-A RNA fra MP4-G cellelinien. Ingen hybridisering til denne RNA blev påvist i rækken indeholdende poly-A RNA fra MP4 cellelinien. Dette resultat blev tilskrevet overproduktion af EPSPS mRNA af MP4-G cellelinien. Proben EPSP-2, som afviger fra EPSP-1 ved et enkelt nucleotid, udviste sjælden påviselig hybridation til 1,9 kb mRNA af MP4-G cellelinien, men hyrbidiserede kraftigt til en 1,0 kb mRNA fra begge cellelinier. 1,0 kb DNA var

ikke tilstrækkeligt til at kode for et polypeptid på 50000 dalton, og det antages, at en af sekvenserne i EPSP-2 proben hybridiserede til en hel forskellig sekvens i biblioteket. Disse resultater antydede, at den degenererede probeblanding EPSP-1 indeholdt den korrekte sekvens for EPSPS. Denne blanding blev anvendt ved alle efterfølgende udartede prøvehybridiseringseksperimenter.

E. Præparation af λgt 10 cDNA bibliotek

(a) Anvendte materialer

AMV reverse-transskriptase blev skaffet fra Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, Florida; det store fragment af DNA polymerase I (Klenow-polymerase) var fra New England Nuclear, Boston, MA; S1 nuclease og tRNA var fra Sigma; AcA 34 kolonne-harpiks var fra LKB, Gaithersburg, MD; EcoRI, EcoRI methylase og EcoRI-linkere var fra New England Biolabs, Beverly MA; RNasin (ribonuclease-inhibitor) var fra Promega Biotech, Madison, Wisc., og alle radioaktive forbindelser fra Amersham, Arlington Hts., IL.

λgt10 vektoren (ATCC No. 40179) og associerede E. coli cellekulturer leveredes fra Thanh Huynh og Ronald Davis ved Stanford University Medical School (se Huynh 1985). Denne vektor havde tre vigtige egenskaber: (1) den havde et unikt EcoRI indsætningssæde, som undgik behovet for at fjerne en central portion af DNA fra fagen DNA før indsætning af ny DNA, (2) DNA af varierende størrelse fra 0 til omkring 8000 baser kan klones ved hjælp af denne vektor, og (3) et bibliotek kan behandles ved hjælp af E. coli MA150 celler (ATCC nr. 53104) til fjernelse af kloner, som ikke har DNA-indsætninger.

(b) cDNA første streng-syntese

Poly-A mRNA fremstilledes som beskrevet i eksempel 1.D.a, og resuspenderedes i 50 mM tris (pH = 8,5), 10 mM $MgCl_2$, 4 mM DTT, 40 mM KCl, 500 µM af d(AGGT)TP, 10 µg/ml $dT_{12\ 18}$primer og 27,5 enheder/ml RNasin. I en 120 µl reaktionsvolumen tilsattes 70 enheder reverse-transkriptase pr. 5 µg poly-A RNA. Et reaktionsglas indeholdt α-^{32}P-dCTP (5 µCi/120 µl reaktion) af cDNA-størrelse og udbytte og til at opnå en første streng-markør til styring af senere reaktioner. For at afbryde mRNA-sekundær struktur blev mRNA i vand inkuberet ved 70 °C i 3 minutter, og røret blev afkølet på is. Reverse-transskriptase blev tilsat, og cDNA-syntesen blev udført ved 42 °C i 60 minutter. Reaktionen blev afsluttet ved tilsætning af EDTA til 50 mM. cDNA-udbyttet blev styret ved TCA-udfældninger af prøver, fjernet ved starten af reaktionen og efter 60 minutter. Efter cDNA-syntese eksisterede cDNA som et cDNA-RNA-hybrid. cDNA-RNA-hybridet blev denatureret ved opvarmning af blandingen i kogende vandbad i 1,5 minutter og afkøling på is.

(c) Anden streng DNA-syntese

Enkelt-strengede cDNA blev benyttet til supplering med den anden streng-syntese. Både Klenow-polymerase og reverse-transskriptase blev anvendt til omdannelse af ss cDNA til ds cDNA. Klenow-polymerase anvendes først, eftersom dens 3'-5'-exonuclease-reparationsfunktion antages at kunne omsætte ikke-flush DNA-ender, som er dannet ved den spontane selv-supplering og kan udstrække disse flush-ender med polymerase-aktiviteten. Reverse-transskriptase anvendes i tilslutning til Klenow-polymerase, fordi reverse-transskriptase antages at være mindre tilbøjelig til at stoppe for tidligt, at så snart den er knyttet til en skabelon-streng. Klenow-polymerasereaktionen foregik i 100 µl rumfang eksklusiv enzymet. Reaktionsblandingen omfatter 50 mM HEPES, pH = 6,9, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 500 µM af hver dNTP og cDNA. For at starte reaktionen blev 20 - 40 enheder Klenow-polymerase (sædvanligvis mindre end 5 µl) tilsat, og reaktionsglas set blev dyrket ved 15 °C i 5 timer. Reaktionen blev afsluttet ved tilsætning af EDTA til 50 mM.

Blandingen blev ekstraheret med phenol, og nucleinsyrerne blev udfældet, centrifugeret og tørret.

Reverse-transskriptase-reaktionen til yderligere at forlænge den anti-komplementære DNA-steng blev udført som beskrevet for reaktionen til den oprindelige syntese af cDNA, med den ændring, at dT_{10-18}-primer og RNasin var fraværende, og 32 enheder reverse-transskriptase blev anvendt i en 120 µl reaktionsblanding. Reaktionen blev afsluttet ved tilsætning af EDTA til 50 mM. Blandingen blev ekstraheret med samme rumfang phenol, og nucleinsyren blev udfældet, centrifugeret og tørret.

(d) S1 nuclease-behandling

200 µl 2 x S1 puffer (1 x S1 puffer er 30 mM natriumacetat, pH = 4,4, 250 mM NaCl, 1 mM $ZnCl_2$), 175 µl vand og 525 enheder S1 nuclease sattes til glasset indeholdende 125 µl af reaktionsproduktet ved syntese af den anden streng. Røret blev dyrket ved 37 °C i 30 minutter, og reaktionen blev afsluttet ved tilsætning af EDTA til 50 mM. Blandingen blev ekstraheret med lige rumfang phenol/chloroform (1:1). Den vandige fase blev ekstraheret med ether til fjernelse af resterende phenol. DNA blev udfældet med ethanol og lufttørret.

(e) EcoRI methyleringsreaktion

Da ds cDNA'er blev kopieret fra et stort antal mRNA, indeholdt mange af de dannede ds cDNA'er sandsynligvis interne EcoRI restriktionssteder. Det var ønsket at beskytte sådanne spaltningssteder fra EcoRI spaltning for at muliggøre anvendelsen af stump-endet EcoRI-linkere, som derefter blev fraspaltet med EcoRI til dannelse af kohæsive overhæng ved enderne.

Med det formål at forhindre uønsket spaltning af interne EcoRI steder blev ds cDNA methyleret ved hjælp af EcoRI methylase. DNA-piller blev opløst i 40 µl 50 mM tris pH = 7,5, 1 mM EDTA, 5 mM DTT. Fire µl 100 µm S-adenosyl-L-methionin og 2 µl (80 enheder) EcoRI methylase blev tilsat. Glassene blev inkuberet ved 37 °C i 15 minutter og derefter ved 70 °C i 10 minutter til at dræbe methylasen.

Det blev derefter opdaget, at den i det efterfølgende beskrevne methyleringsreaktion ikke var egnet til at forhindre EcoRI-spaltning ved et internt sted indenfor EPSPS-kodningsregionen, øjensynlig p.g.a. inaktivt methylasereagens. Spaltningen af det interne EcoRI-sted krævede yderligere trin til isolering af den fulde længde cDNA som ovenfor beskrevet. For at undgå sådanne yderligere trin, hvis et andet bibliotek dannes, må methyleringsreagenserne og reaktionsbetingelserne anvendes samtidigt på cDNA og på kontrol af fragmenter af DNA, og beskyttelse af kontrolfragmenterne skulle bekræftes ved EcoRI-reaktion, før reaktionen udføres på cDNA.

(f) DNA-polymerase I udfyldningsreaktion

Til glasset indeholdende 45 µl cDNA (forbehandles som ovenfor beskrevet) sattes 5 µl 0,1 M $MgCl_2$, 5 µl 0,2 mM d(ACGT)TP og 10 enheder DNA-polymerase I. Glasset blev dyrket ved stuetemperatur i 10 minutter. Reaktio-

nen blev afsluttet ved tilsætning af EDTA til 25 mM. Et mikrogram ikke-skåret λgt10 DNA blev tilsat som bærer, og blandin gen blev ekstraheret med phenol/chloroform (1:1). Nucleinsyren i blandingen blev udfældet med phenol/chloroform (1:1). Nucleinsyren i blandingen blev udfældet med ethanol, centrifugeret og tørret.

(g) Ligering af EcoRI-linkere til methyleret ds cDNA

Ca. 400 pmol EcoRI-linkere (5'CGGAATTCCG3') opløstes i 9 µl 20 mM Tris, pH = 8,0, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT indeholdende 50 µCi α-^{32}P-ATP (5000 Ci/mmol) og 2 enheder T4 polynucleotid-kinase. Oligonucleotiderne dyrkedes ved 37 °C i 30 minutter, hvorved de adderedes til dannelse af dobbeltstrengede stump-endet linkere. 2 enheder T4 polynucleotid-kinase og 1 µl 10 mM ATP tilsattes og dyrkedes ved 37 °C i yderligere 30 minutter. Linkerne opretholdes ved -20 °C. Den methylerede DNA-pille blev resuspenderet i glas indeholdende 400 pmol kinasebehandlede linkere. Ligering af EcoRI-linkere til den methylerede DNA blev udført ved tilsætning af 1 µl T4-ligase, og reaktionsblandingen blev dyrket ved 12 - 14 °C i 2 dage.

(h) Spaltning med EcoRI til dannelse af kohæsive termini

Til 11 µl af reaktionsproduktet fra eks. 1.E.(g) sattes 10 µl af en opløsning af 50 mM Tris, pH = 7,5, 10 mM $MgSO_4$, 200 mM NaCl. T4 DNA-ligasen blev varmeinaktiveret ved 70 °C i 10 minutter. 40 enheder EcoRI blev tilsat, og dyrkningen fortsattes med 37 °C i 3 timer. Reaktionen blev afsluttet ved tilsætning af EDTA til 50 mM. Prøven blev klaret ved centrifugering og påført en AcA 34 kolonne.

(i) AcA 34 kolonnechromatografi

Frie linkere (ikke ligeret til ds cDNA) blev fjernet fra ds cDNA med tilknyttede linkere til at forhindre dem i at interferere med indsætningen af den ønskede ds cDNA i kloningsvektorerne. AcA 34 harpiks (en blanding af acrylamid og agaroseperler, normalt anvendt til overtrækning) blev forudkvældet i 2 mM citratpuffer og 0,04% natriumacid i vand og sat til 1 ml mærke af en 1 ml plastiksprøjte, lukket med glasuld. Kolonnen blev ækvilibreret med 10 mm Tris-HCl pH = 7,5, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl. Blandingerne af ds cDNA med ligerede linkere og frie linkere (svarende til 45 µl) indførtes i 400 mM NaCl. 1 µl 0,5% bromphenolblåt farvestof (BPB) blev tilsat, og prøven blev påført kolonnen, som blev kørt i ækvilibreringspuffer ved stuetemperatur. Ti 200 µl fraktioner blev opsamlet. BPB-farve eluerede normalt fra kolonnen i det sjette glas eller senere. Glas 1 og 2 blev forenet og anvendt som kilde for ds cDNA for kloning.

(i) Sammensætning af λgt10-kloner

Det dannede ds cDNA blandedes med 1 µg EcoRI-skåret λgt10 DNA, fældet med ethanol, og centrifugeret. Efter vask af pillerne en gang med 70% ethanol, blev DNA-pillerne lufttørret og resuspenderet i 4,5 µl 10 mM Tris-HCl pH = 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl. Til fastgøring og ligering af cDNA-indsætningen til de venstre og højre arme af λgt10 DNA, blev blandingen opvarmet til 70 °C i 3 minutter, derefter til 50 °C i 15 minutter. Blandingen blev afkølet på is, og 0,5 µl af hver af 10 mM ATP, 0,1 M DTT og tilstrækkeligt T4 DNA-ligase til sikring af mindst 90% afslutning blev tilsat. Reaktionsblandingen blev dyrket ved 14 °C i 18 timer, hvorved dannedes ind sætningen af ds cDNA i EcoRI stedet af λgt10 DNA. Den dannede DNA blev pakket i fag-partikler in vitro ved fremgangsmåden ifølge Scherer 1981.

(k) Fjernelse af fager uden indsætninger

Indsætning af cDNA i EcoRI-stedet af λgt10 resulterer i en aktivering af C1-genet. λgt10-fager med indaktiverede C1-gener (dvs. med indsætninger) replikerer normalt i E. coli MA150 celler. I modsætning hertil vil λgt10-fager uden indsætninger være ude af stand til at replikere i MA150 stammer af E. coli. Dette udgør en metode til at fjerne λgt10-kloner, som ikke har nogen indsætninger. Fagerne i biblioteket blev først replikeret i E. coli C600 (M^+R^-) celler, som modificerede λgt10 DNA til beskyttelse fra E. coli MA150 restriktionssystemet. Et relativt lille antal E. coli C600 celler blev inficeret og derefter tilført et 20 fold overskud af MA150 (M^+R^+) celler. Den primære infektion forekom således i M^+R^- cellerne, hvor alle fagerne vil gro, men successive trin for replikation skete i MA150 cellerne, som forhindrede replikation af fager uden indsætninger. Det behandlede fag-bibliotek blev opsamlet med pladerne, og efter fjernelse af agar og andre forureninger ved centrifugering var rekombinantfagerne parat til anvendelse i screeningsforsøg.

F. Screening på cDNA-bibliotek; selektion af pMON9531

Ca. 6000 fager (hver plade) blev spredt på 10 cm x 10 cm kvadratisk der af fast NZY agar (Maniatis 1982) med 0,7% agarose. Et translucentlag af E. coli MA150 celler dyrkedes på pladerne. De arealer, hvor fagerne inficerede og dræbte E. coli cellerne var angivet ved et klart areal som kaldes "plaque", som var synlig i forhold til laget af bakterier efter 18 timers inkubation af pladerne ved 37 °C. Seks plader blev fremstillet på denne måde. Plaquen blev presset over for forududskårne nitrocellulosefiltre i ca. 30 minutter. Derved blev dannet symmetriske kopier af plaquen. For at fæstne fag DNA blev filtrene behandlet med 0,5 M NaOH og 2,5 M NaCl i 5 minutter. Filtrene blev derefter behandlet i rækkefølge med 1,0 M Tris-HCl, pH = 7,5 og 0,5 M Tris-HCl, pH = 7,5 indeholdende 2,5 M NaCl til neutralisering af NaOH. Derefter blev de fældet i chloroform til fjernelse af bakterie-debris. De blev derpå luft-

tørret og bagt under et vakuum ved 80 °C i 2 timer og henstillet til afkøling til stuetemperatur. Filtrene blev dernæst hybridiseret med ^{32}P-mærket EPSP-1 probe (2 x 10^6 cpm/filter) som beskrevet i eksempel 1.D(e). Efter 48 timers hybridisering blev filterne vasket i 6 x SSC ved stuetemperatur to gange i 20 minutter og derefter ved 37 °C i 5 minutter. Disse vaskninger fjernede ikke-specifikt bundede probe-molekyler, medens probe-molekyler med den nøjagtige tilsvarende sekvens (som var ukendt på tidspunktet) forblev bundet til fag-DNA på filtret. Filterne blev analyseret ved autoradiografi efter den afsluttende vask. Efter det første screeningstrin fremkom syv positivt hybridiseringssignaler som sorte pletter på autoradiogrammerne. Disse plaquer blev fjernet fra pladerne og atter overført til friske plader med en tæthed på 100 - 200 plaques/plade. Disse plader blev screenet ved den ovenfor beskrevne procedure. Fire positivt hybridiseringsfager blev udvalgt. DNA blev isoleret fra hver af disse fire kloner og behandlet med EcoRI til bestemmelse af størrelsen af cDNA-indsætningerne. Klonen indeholdende den største cDNA-indsætning, ca. 330 basepar, blev udvalgt og betegnet λE3. cDNA-indsætningen fra λE3 blev indsat i plasmidet pUC9 (Vieira 1981), og det dannede plasmid blev betegnet pMON9531.

For at få bekræftet, at pMON9531 kloning indeholdt den ønskede EPSPS-sekvens, blev indsætningen fjernet fra pMON9531 klonen ved omsætning med EcoRI. Dette DNA-fragment blev derefter sekvensbestemt ved kemisk nedbrydning efter en metode af Maxam 1977. Aminosyresekvensen afledt af nucleotid-sekvensen svarede til EPSPS-partiel aminosyresekvens vist i tabel 1.

G. Skabelse af F7 genomisk DNA-klon

For at opnå hele EPSPS-genet blev kromosomalt DNA fra MP4-G cellelinien behandlet med BamHI og klonet i en fag-vektor til dannelse af et bibliotek,

som blev screenet under anvendelse af partiel EPSPS-sekvens fra pMON9531 som en probe.

(a) Fremstilling af MP4-G kromosomalt DNA-fragmenter

MG4-G celler blev frosset og pulveriseret i en morter med knust glas i nærværelse af flydende nitrogen. De pulveriserede celler blev blandet med 8 ml/g kold lysis-puffer indeholdende 8,0 M urinstof, 0,355 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl(pH = 7,5), 0,02 M EDTA, 2% sarkosyl og 5% phenol. Blandingen omrørtes med en glasstav til at løsne de store klumper. Samme rumfang af en 3,1 blanding af phenol og chloroform indeholdende 5% isoamylalkohol blev tilsat. Natriumdodecylsulfat (SDS) blev tilsat til en slutkoncentration på 0,5%. Blandingen blev svinget på en roterende platform i 10 - 15 minutter ved stuetemperatur. Faserne blev adskilt ved centrifugering ved 6000 x g i 15 minutter. Phenol/chloroform-ekstraktion blev gentaget. Natriumacetat blev sat til den vandige fase til en slutkoncentration på 0,15 M, og DNA blev udfældet med ethanol. DNA blev opsamlet ved centrifugering, opløst i 1 x TE (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 1 mM EDTA) og opløst i bånd i en CsCl-ethidiumbromidgradient. DNA blev opsamlet ved punktering af siden af røret med en nål af størrelsen 16. Ethidiumbromidet blev ekstraheret med CsCl-mættet isopropanol, og DNA blev dialyseret kraftigt over for 1 x TE. Ca. 400 µg af DNA blev isoleret fra 12 g celler.

MP4-G kromosomal DNA (10 µg) blev behandlet til afslutning med 30 enheder BamHI i en puffer indeholdende 10 mM Tris, pH = 7,8, 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl i 2 timer ved 37 °C. DNA blev ekstraheret med phenol efterfulgt af ekstraktion med chloroform og udfældning med ethanol. DNA-fragmenterne blev suspenderet i 1 x TE ved en koncentration på 0,5 µg/µl.

(b) Kloning af MP4-G kromosomalt DNA-fragmenter i MG14

DNA fra fag λMG14 (skaffet fra Dr. Maynard Olson af Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri), fremstilledes ifølge Maniatis 1982. 150 µg DNA omsattes til ende med BamHI i en puffer indeholdende 10 mM Tris-HCl, pH = 7,8 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl. Behandlingens afslutning blev kontrolleret ved elektroforese gennem 0,5% agarose-gel. Fag-DNA blev derefter ekstraheret to gange med phenol-chloroform-isoamyl-alkohol (25:24:1) og udfældet med ethanol. DNA blev resuspenderet i 1 x TE ved en koncentration på 150 µg/ml. $MgCl_2$ blev tilsat til 10 mM og dyrket ved 42 °C i 1 time til opnåelse af de kohæsive ender af λDNA til sammenknytning igen. Denne blev kontrolleret ved agarosegel-elektroforese.

Efter sammenknytningen blev DNA lejret over en 38 ml (10 - 40%, w/v) saccharose-gradient i et Beckman SW27 ultracentrifuge-glas. Gradientopløsningerne fremstilledes i en puffer indeholdende 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH = 8,0), 5 mM EDTA. 75 µg DNA blev afsat på hver gradient. Prøverne blev centrifugeret ved 26000 rpm i 24 timer ved 15 °C i en Beckman SW27 centrifuge. Fraktioner (0,5 ml) blev opsamlet fra toppen af centrifuge-røret og analyseret for tilstedeværelse af DNA ved gel-elektroforese. Fraktionerne indeholdende de sammenknyttede venstre og højre arme af λDNA blev slået sammen, dialyseret over for TE og ethanol-fældet. Bundfaldet blev vasket med 70% ethanol og tørret. DNA blev opløst i TE ved en koncentration på 500 µg/ml.

De rensede arme af vektoren DNA og BamHI-fragmenter af MP4-G DNA blev blandet i et molært forhold på 5:1 og 2:1 og ligeret under anvendelse af TfDNA-ligase i en ligase-puffer indeholdende 66 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 5 mM MgCl2, 5 mM DTT og 1 mM ATP. Ligeringer udførtes i 18 timer ved 15 °C. Ligeringen blev kontrolleret ved agarosegel-elektroforese. Ligeret fase DNA med indsætninger af MP4-G DNA blev pakket i fag-capsider in vitro un-

der anvendelse af tilgængelige pakningsekstrakter (Promega Biotech, Madison, WI). Den pakkede fag blev overført til 10 cm x 10 cm plader af NZY agar i 0,7% agarose med en tæthed på ca. 6000 plaques pr. plade under anvendelse af E. coli C600 celler. Efter inkubering i 18 timer ved 37 °C var der dannet plaques, og pladerne blev fjernet fra inkubatoren og afkølet til 4 °C i mindst 1 time. Agarpladerne blev presset imod nitrocellulosefiltre i 30 minutter til overførsel af fager til filtrene, og DNA-fag en blev fæstnet til filtrene som ovenfor beskrevet. Hvert filter blev hybridiseret i 40 timer ved 42 °C med ca. 1,0 x 106 cpm/filter af den 330 bp cDNA-indsætning, isoleret fra pMON9531-klonen, som var hak-translateret ved en fremgangsmåde beskrevet i Maniatis 1982. Den specifikke aktivitet af proben var 2-3 x 108 cpm/µg DNA. Hybridiseringen udførtes i en opløsning indeholdende 50% formamid, 5x SSC, 5x Denhardt's opløsning, 200 µg/ml tRNA og 0,1% SDS. Filtrene vaskedes i 1 x SSC, 0,2% SDS ved 50 °C og autoradiograferedes. Flere positive signaler blev iagttaget, og parret med plaques på den tilsvarende plade. Det udvalgte plaque blev udtaget, suspenderet i SM-puffer og anbragt på plader af NYZ-agar. Screeningsprocessen for kopipladen blev gentaget med lavere tæthed, indtil alle plaques på pladerne udviste positive signaler. Et isolat blev udvalgt til yderligere analyse og blev betegnet λF7 fagklon.

H. Skabelse af pMON9543 og pMON9556

DNA fra λF7 behandledes (separat) med BamHI, BglII, EcoRI og HindIII. DNA blev hybridiseret med en hak-translateret EPSPS-sekvens fra pMON9531 i en Southern blot-procedure. Dette angav, at den komplementære sekvens fra λF7 var på et 4,8 kb BglII fragment. Dette fragment indsattes plasmid pUC9 (Vieira 1982) repliceredes, hak-translateredes og anvendtes som i petunia cDNA bibliotek, under anvendelse af hybridiseringsbetingelserne beskrevet i eksempel 1.G med 10^6 cpm pr. filter. En cDNA-klon med

en sekvens, der binder λF7-sekvensen, blev identificeret og betegnet pMON9543.

DNA-sekvens-analyse (Maxam 1977) angav, at pMON9543 ikke indeholder stop-kodon eller 3'-ikke-translaterede region af EPSPS-genet. Derfor blev EPSPS-sekvensen fjernet fra pMON9543, hak-translateret og anvendt som en probe til screening af cDNA-biblioteket igen en klon, som hybridiserer med EPSPS-sekvensen blev identificeret og betegnet som pMON9556. DNA-sekvens-analysen angiver, at indsætningen i denne klon indeholdt hel 3'-regionen af EPSPS-genet, inklusiv en polyadenyleret hale. 5' EcoRI enden af denne indsætning passede med 3' EcoRI og EPSPS-indsætningen i pMON9531. En hel EPSPS-kodningssekvens blev skabt ved ligering af EPSPS-indsætninger fra pMON9531 og pMON9556.

I. Skabelse af pMON546 vektor med CaMV 35S/EPSPS-gen

EPSPS-indsætning i pMON9531 blev modificeret ved sæde-dirigeret mutagenese (Zoller et al, 1983) under anvendelse af en M13-vektor (Messing 1981 og 1982) til dannelse af et BglII-sæde i den 5' ikke-translaterede region af EPSPS-genet. Den modificerede EPSPS-sekvens isoleredes ved EcoRI og BglII-nedbrydning og indsætning i en plantetransformationsvektor, pMON530, til opnåelse af pMON536, som vist på fig. 2. pMON530, et derivat af pMON505 omfattende 35S-NOS kassette, blev tilvejebragt ved overførsel af 2;3 kb StuI-HindIII-fragmentet af pMON316 i pMON526. Plasmid pMON316 (se fig. 5) er en co-integrerende type mellemproduktvektor med unik spaltningssteder for restriktionsendonucleaser BglII, ClaI, KpnI, XhoI og EcoRI, beliggende mellem 5'-styredelen og NOS polyadenyleringssignaler. Spaltningssæderne muliggør indsætningen af kodningssekvenser, der bærer deres egne translationsinitieringssignaler umiddelbart op til CaMV 35S transskribt styresekvensen. 316 plasmidet opretholder alle egenskaber for pMON200 inklusive spektinomycin-resistens til udvælgelse i E. coli og A. tu-

mefaciens samt et kimærisk kanamycin (NOS/NPTII/NOS) til udvælgelse af transformerede plantevæv og nopalinsyntasegenet for let registrering af transformanter og arveegenskaber i afkommet. Plasmid pMON526 er et simpelt derivat af pMON505, hvori SmaI-sædet var fjernet ved nedbrydning med XmaI, behandling med Klenow-polymerase og ligering. Det resulterende plasmid, pMON530 (fig. 2) opretholder egenskaberne for pMON505, og 35S-NOS-udtrykkelseskassetten indeholder nu et unikt spaltningssæde for SmaI mellem promotoren og poly-adenyleringssignalerne. 1,62 kb EcoRI-EcoRI fragmenterne fra pMON9556 blev derpå indsat i pMON536 til opnåelse af pMON546. Da pMON530 allerede indeholdt en 35S promotor fra et blomkålsmosaik-virus (CaMV) nærmest BglII sædet , hvilket skabte et kimærisk CaMV/EPSPS-gen i pMON546.

Som vist på fig. 2 indeholdt plasmid pMON546 (1) CaMV 35S/EPSPS-genet; (2) en selektionsmarkør-gen for kanamycin-resistens (Kan^R); (3) et nopalinsyntase (NOS) gen som en markør; og (4) en T-DNA højregrænse, som effektivt får hele plasmidet til at blive behandlet som et "transfer DNA" (T-DNA) område med A. tumefaciens celler. Dette plasmid blev indsat i A. tumefaciens celler indeholdende et hjælper-plasmid pGV3111SE. Hjælperplasmidet kodet for visse enzymer som er nødvendige for at få DNA fra pMON546 indsat i plantecellekromosomerne. Det indeholder også et kanamycin-resistent gen, der fungerer i bakterier.

En kultur af A. tumefaciens indeholdende pMON546 og pGV3111-SE næev deponeret i American Type Culture Collection (ATCC) den 2. august 1985 med betegnelsen ATCC nr. 53213. Om ønsket kan enhver af disse plasmider isoleres fra denne kultur af celler på i og for sig kendt måde. For eksempel kan cellerne dyrkes med E. coli celler, som indeholder et mobiliseringsplasmid, såsom pRK2013 (Ditta 1980). Celler som bliver Spc/str^R, kanSvil indeholde pMON546, medens celler der bliver Kan^R, spc/str^S vil indeholde pGV3111-SE.

Eksempel 2: Gly^R Petunia-celler

Bladskiver med diameter på 6 mm blev taget fra overfladesteriliserede petunia-blade. De blev dyrket på MS104 agarmedium i 2 dage til opnåelse af partiel cellevæggedannelse ved de sårede overflader. De blev derefter neddykket i en kultur af A. tumefaciens celler indeholdende både pMON546 og GV3111-SE, som var blevet dyrket i 18 timer i en Luria-væske ved 28 °C og rystet blidt. Cellerne blev fjernet fra bakteriesuspensionen, blottet tør og inkuberet omvendt på filterpapir, placeret over "nurse"-kulturer af tobaksceller som beskrevet i Horsch 1981. Efter 2 til 3 dage blev skiverne overført til Petriskåle indeholdende MS-medier med 500 µg/ml carbenicillin og 0, 0,1, 0,25 eller 0,5 mM glyphosat (natriumsalt) uden nurse-kulturer.

Der blev dannet kontrolvæv under anvendelse af A. tumefaciens celler indeholdende hjælper-plasmidet pGV3111-SE og en anden plantetransformationsvektor, pMON505, der indeholder en T-DNA-region med et NOS/NPTII/NOS kanamycin-resistent gen og en NOS selekterbar markørgen, identisk med pMON546, men uden CaMV/EPSPS-genet.

I løbet af 10 dage efter overførsel til medier indeholdende glyphosat fremkom kallus-væv med aktiv vækst påperiferien af alle skiver af kontrolpladen uden indhold af glyphosat. På medier indeholdende 0,1 mM glyphosat var der ringe påviselig forskel mellem kontrolskiverne og det transformerede væv. Ved 0,25 mM glyphsat var der meget lille vækst af kallus fra kontrolskiverne, medens en væsentlig vækst af transformeret væv forekom. Ved 0,5 mM glyphosat var der ingen kallusvækst fra kontrolskiverne, medens et væsentligt antal af calli voksede fra de transformerede skiver. Dette bekræfter, at CaMV/EPSPS-gen overførte glyphosat-resistens til de transformede celler.

Eksempel 3: Gly^R-tobaksceller

Bladskiver blev udskåret fra tobaksplanter (N. tabacum), og behandlet som beskrevet for A. tumefaciens celler indeholdende pMON546 (eller pMON505, for kontrolceller) og hjælper-plasmid pGV3111-SE. Cellerne transformeret med CaMV/EPSPS genet, skabte væsentlige mængder kallus-væv på 0,5 mM glyphosat, medens cellerne uden dette gen ikke viste påviselige mængder kallus-væv.

Eksempel 4: Gly^R soyabønneceller

Steril hypocotyl-stykker af Glycine canescens, en type soyabønner, blev inficeret med A. tumefaciens-stammen indeholdende den kimæriske EPSPS-gen beskrevet i eksempel 2. Nurse-kulturplader dannedes med et medium af 10% af normal styrke af MS-salte (GIBCO), B5 vitaminer, 3 g/l saccharose, 2 mg/l napthaleneddikesyre, 1 mg/l benzyladenin og 0,5 mM arginin. pH-værdien indstilledes til 5,7 før autoklavering.

De inficerede soyabønne-hypocotyler blev inkuberet ved 26 °C i 2 dage og overført til et tilsvarende medium (med den ændring, at MS-saltene ikke blev fortyndet) og yderligere indeholdende 500 mg/l carbinicillin, 100 mg/l cefotaxim og 100 mg/l kanamycin. Under disse betingelser var kun transformeret soyabønne-kallus i stand til at vokse. Der blev fremstillet kontrolvæv under anvendelse af A. tumefaciens celler indeholdende hjælper Ti plasmidet pTiT37-SE og en plantetransformationsvektor pMON200. Se Fraley æet al, Biotechnology Vol. 3, 1985, beskrevet heri. Co- integratet pTiT37-SE indeholdt en T-DNA-region med et NOS/NPTII/NOS kanamycin-resistent gen og et NOS-markør-gen, identisk med pMON200, men uden CaMV 35S/EPSPS/NOS-genet.

Dette disarmerede nopalin-type Ti plasmid dannedes af pTiT37 på analog måde som beskrevet af Fraley et al. (1985) før dannelse af pTiB6S3-SE disarmeret octopin-type Ti plasmid. Den generelle procedure er at erstatte hovedparten af T-DNA med en selekterbar markør og pBR322 og LIH segmenter fra pMON200 til opnåelse af en region af homologi for rekombination med pMON200 og derivater. Denne erstatning førte til fjernelse af den længst til højre stående del på ca. 80% af T-DNA inklusiv phytohormon biosyntetiske gener, nopalin-syntase-genet og den højre grænse af T-DNA.

Kilden for pTiT37-sekvenser var plasmidet MINI-Ti beskrevet af deFramond et al. (Bio/Technology 1: 262, 1983). Dette plasmid er en bekvem kilde; de samme Ti plasmid-segmenter kan dog opnås direkte fra pTiT37 eller beslægtede pTiC58 plasmid eller fra subkloner af disse plasmider, isoleret af andre, såsom beskrevet af Hepburn et al. (J. Mol. Appl. Genetics 2: 211-224, 1983) eller Zahm et al. (Mol Gen Genet 194: 188-194, 1984).

Plasmid MINI-Ti er et derivat af pBR325, der bærer pTiT37 KpnI-fragmenterne 13b, 4 og 11 (deFramond et al., 1983) som er analoge med pTiC58 KpnI-fragmenter 13, 3 og 12 (Depicker et al., Plasmid 3: 193-211, 1980). De interne T-DNA-sekvenser med phytohormon-biosyntetiske gener og højre grænse fjernedes fra MINI-Ti ved behandling med HindIII og religering til pMON284. pMON284 plasmidet indeholder et unikt KpnI-sæde, som omdannedes til et BamHI-sæde ved spaltning med KpnI og indsætning af følgende syntetiske linker:

5'- CGGATCCGGTAC
CATGGCCTAGGC

som indeholder et BamHI-sæde (5'-GGATCC) i center af linkeren. En plasmid indeholdende denne linker blev isoleret og benævnt pMON293.

pMON293 plasmidet bærer de følgende pTiT37-fragmenter tilknyttet hverandre i omvendt orientering i forhold til deres orientering i Ti plasmidet og sammenknyttet gennem en BamHI-linker. Først sidder KpnI-sædet ved den højre ende af 13b fragmentet. Dette fragment indeholder den venstre grænse af pTiT37 T-DNA. Dernæst kommer den venstre ende af 13b fragmentet tilknyttet BamHI-linkeren. Forbundet med denne er den højre ende af KpnI 11 fragmentet. Dette fragment indeholder Ti plasmidet beliggende til højre for T-DNA og ender med et HindIII-sæde, som ligger ved den højre ende af pTiC58 HindIII 2 fragmentet (Depicker et al., 1980). Denne er sluttet til pBR325 derivat-plasmidet, som også er smeltet sammen med KpnI-sædet ved den højre ende af KpnI 13b fragmentet.

For at indføre homologi for pMON200 og en kanamycin-resistent selekterbar markør for A. tumefaciens mellem pTiT37 segmenterne, blev plasmid pMON292 konstrueret. Plasmid pMON292 er et derivat af pMON113, som består af 2,6 kb pBR322 PvuII til HindIII fragmentet tilsluttet 1,7 kb BglII (nucleotid 1617) til HindIII (nucleotid 3390, Barker et al., Plant Mol. Biology 2: 335, 1983) fragment af octopin-type T-DNA af pTiA6. Dette segment, benævnt LIH, er tidligere beskrevet af Fraley et al. (1985). BglII-sædet var gjort flush-endet ved behandling med Klenow-polymerase før ligering med pBR322 segmentet.

Plasmid pMON113 blev spaltet med HindIII, behandlet med Klenow-polymerase og forbundet med 1,2 kb AvaII fragmentet af Tn903 Oka et al J. Mol. Biol. 147:217 (1981) (601), som var behandlet med Klenow-polymerase, ligeret til syntetisk BamHI-linkere, omsat med BamHI og atter behandlet med Klenow-polymerase. Det resulterende plasmid med Tn903 kanamycin-resistent determinant knyttet til LIH-segmentet benævntes pMON292.

Plasmid pMON113 blev spaltet med HindIII, behandlet med Klenow-polymerase og forbundet med 1,2 kb AvaII-fragmentet af Tn903 Oka et al J.

Mol. Biol. 147:217 (1981) (601), som var behandlet med Klenow-polymerase, ligeret til syntetisk BamHI-linkere, omsat med BamHI og atter behandlet med Klenow-poolymerase. Det resulterende plasmid med Tn903 kanamycin-resistent determinant knyttet til LIH-segmentet benævntes pMON292.

pMON200 homologi-regionen og bakteriel kanamycin-resistent markør indsattes mellem pTiT37-segmenterne ved blanding af pMON292 lineariseret ved spaltning med HincII med to fragmenter afledt af pMON293: et 2,5 kb PvuII-BamHI-fragment og et 4,5 kb fragment isoleret efter spaltning med HindIII, Klenow polymerase-behandling, og spaltning med BamHI. Det resulterende plasmid, pMON313, bærer følgende fragmenter i denne orden. Først er BamHI-linkeren efterfulgt af et 4,5 kb KpnI-HindIII fragment afledt fra den højre side af pTiT37 KpnI fragment 1. Dette er sluttet til 750 bp HincII-HindIII segmentet af pBR322 efterfulgt af 1,2 kb Tn903 segmentet, som koder for kanamycin-resistens. Dette er fulgt af LIH (HindIII-BglII-segmenet og PvuII-HincII-segmentet af pBR322, som bærer originalen til replikation. Dernæst er et 2,5 kb PvuII til KnpI-fragment fra den venstre ende af pTiT37 KpnI 13b fragmentet, som indeholder den venstre grænse af T-DNA. Endelig er dette tilsluttet begyndelses BamHI-linkeren.

For at indføre denne DNA i Agrobacterium blev pMON313 spaltet med BamHI og blandet med pRK290 DNA, som var blevet spaltet med BglII og behandlet med DNA-ligase. Et derivat af pRK290 med pMON313 plasmidet blev isoleret og benævnt pMON313.

Plasmid pMON313 blev indført i Agrobacterium tumefaciens stamme A208, som bærer pTiT37 og en kromosomal chloramphenicol resistens ved standard bakteriel parringsmetoder under anvendelse af pRK2013 som en hjælper. Denne metode og efterfølgende udvælgelse for erstatning af T-DNA med det tilpassede T-DNA-segment båret i pMON318 var nøjagtigt som be-

skrevet af Fraley et al. (1985) for selektion af det disarmerede octopin-type pTiB6S3-SE plasmid.

Det dannede disarmerede pTiT37-SE plasmid indeholder den oprindelige region intakt og opretholder den venstre T-DNA-grænse og ca. 1 kb af T-DNA. Denne region af T-DNA har ikke været rapporteret til at kunne transskribere (Joos et al., Cell 32: 1057-1067, 1983). Dette efterfølges af pBR322-segment og LIH og dernæst Tn903 kanamycin-resistens. Tn903-segmentet er tilknyttet et 750 bp segment af af pBR322, som er tilsluttet den venstre ende af pTiT37 analog af pTiC38 HindIII 2 fragment (Depicker et al., 1980). Dette fragment er beliggende uden for den højre ende af pTiT37 T-DNA. Resultatet er, at mere end 90% af T-DNA inklusiv de phytohormone biosyntetiske gener, som er ansvarlige for crown gall-sygdomsproduktion og den højre grænse er fraværende fra pTiT37-SE plasmidet.

pTiT37-SE plasmidet holdes i et derivat af stammen A208, som var udvalgt for vækst i 25 µg/ml chloramphenicol. Denne stamme med disarmeret plasmid er benævnt A208-SE eller ASE og er deponeret den 2. august 1985 som ATCC nr. 53214. A208-SE stammen anvendes som en recipient for pMON200 intermidiær vektor i den tredobbelte parringsprocedure på nøjagtig samme måde som 3111-SE stammen (Fraley et al., 1985). Dette resulterer i et co-intergrat hybrid T-DNA bestående af følgende fra venstre til højre: pTiT37 venstre grænse og ca. 1 kb af sekvens netop inden for grænsen, pBR322 HincII til PvuII-segment, pTiA6 BglII til HindIII LIH region, pMON200 syntetisk multi-linker, NOS/NPTII/NOS kanamycin resistens-gen for selektion i planter Tn7 spektinomycin/streptomycin resistens-determinant, nopalin-syntase gen som en markør for planteceller, den højre grænse af pTiT37 T-DNA. DNA mellem de to netop beskrevne grænsesekvenser og anden DNA indsat i den analoge region af pMON200 og derivater overføres til planteceller under transformationsproceduren.

Efter 14 - 17 dage blev soyabønne-kallus, der var trans formeret med enten vektoren alene (pMON200 plasmid) eller med vektoren indeholdende et kimærisk EPSPS-gen overført til Petriskåle indeholdende MS-medium og 0, 0,5 mM eller 1,0 mM glyphosat.

I løbet af 18 - 20 dage efter overførslen til medierne indeholdende glyphosat fremkom aktiv væskt af kallus-væv i alle skiverne uden indhold af glyphosat. På medium indeholdende 0,5 mM glyphosat var der ringe vækst i skiverne indeholdende kontrol-kallus, dvs. kallus indeholdende pMON200 vektor alene, medens nogen kallus-kolonier indeholdende det kimæriske EPSPS-gen som beskrevet i fig. 2 udviste tydelig vækst. Ved 1,0 mM glyphosat var der ingen kallusvækst fra kontrolvævet, og atter var der nogen vækst af transformeret kallus indeholdende kimærisk EPSPS-gen. Dette bekræfter, at CaMV 35S/EPSPS/NOS gen indførte glyphosat-resistens i soyabønnecellerne.

Eksempel 5: Gly^R bomuldsceller

En plantetransformationsvektor svarende til pMON546 fremstilles efter den generelle procedure som angivet i eksempel 1 med den ændring, at CTP/EPSPS kodningssekvens opnås fra bomuld. Frø af bomuld (cultivator Delta Pine 50) blev overfladesteriliseret ved hjælp af natriumhypochlorit og bragt til spiring in vitro på et basalt medium i mørket. Efter 2 uger blev hypocotyler og cotyledoner skåret af i stykker og podet med en tumorøs stamme af A. tumefaciens indeholdende den ovenfor beskrevne transformationsvektor og hjælper-plasmid pGV3111. Efter 3 dages dyrkning på MS basalt medium blev planterne overført til samme medium med 500 mg/l carbenicillin til dræbning af bakterierne. Efter 2 til 4 uger overføres tumorvæv til det samme medium indeholdende 0,5 mM glyphosat.

Kontrolvæv blev produceret under anvendelse af tumorøs A. tumefaciens celler indholdende hjælper-plasmidet pGV3111 og pMOn200. Væv transformeret med den oven for beskrevne transformationsvektor viser glyphosatresistens ved kontinuert vækst, medens væskt af pMON200 transformeret væv (kontrol) og ikke-transformerede væv er inhiberet.

Eksempel 6: Gly^R oliefrørapsceller

En plantetransformationsvektor svarende til pMON546 fremstilles ved proceduren som er angivet i eksempel 1 med den ændring, at CTP/EPSPS-kodningssekvens er opnået fra rapsplanter, såsom Brassica napus (se eksempel 17).

De fire terminale intervaller fra B. napus planter (vækstkammer dyrket i jord) bliver overfladesteriliseret i natriumhypochlorit og afskåret i 5 mM sektioner. Den øvre overflade af hvert stykke podes med en 18 timer gammel flydende kultur af A. tumefaciens indeholdende den oven for beskrevne transformationsvektor og hjælper-plasmid pTiT37-SE og inkuberes i 2 til 3 dage på nurse-kulturplader indeholdende 1/10 MS-medium med 1 mg/l BA. Eksplanterne bliver derefter overført ti MS-medium indeholdende 1 mg/l BA, 500 mg/l carbenicillin og 100 mg/l kanamycin. Efter 3 til 6 uger er bladvæv fra transgeniske spirer, som har udviklet sig, overført til samme medium, men med 0,5 mM glyphosat i stedet for kanamycin til prøvning for tolerance.

Kontrolvæv fremstilles ved hjælp af A. tumefaciens celler indeholdende hjælper-plasmid pTiT37-SE og vektor pMON200. Transgenisk væv, som udtrykker EPSPS, er i stand til vokse i nærværelse af glyphosat, medens transformerede og ikke-transformerede kontroller inhiberes.

Eksempel 7: Gly^R hørceller

En plantetransformationsvektor svarende til pMON546 fremstilles ved at følge samme fremgangsmåde, som er beskrevet i eksemplerne 1 og 14-17 med den ændring, at CTP/EPSPS-kodningssekvensen fås fra hør.

Hørfrø overfladesteriliseres med 70% ethanol, 25% Chlorox og skylles med sterilt destilleret vand. Frøene placeres på et fast MS-medium og bringes til at spire under belysning i 5 - 7 dage. Hypocotylerne fjernes acceptisk og podes med A. tumefaciens celler indeholdende den ovenfor beskrevne transformationsvektor og hjælper-plasmid pTiB6S3-SE eller pTiT37-SE og henstilles til samtidig dyrkning i 2 dage på MS-medium indeholdende 1 mg/l benzylaminopurin, 0,02 mg/l naphthalensyre og 4% saccharose. Hypocotylerne placeres derefter på MS-medium, tilsat 400 mg/l kanamycin og 500 mg/l carbenicillin. Efter 2 uger er selektionen for transformeret kallus og skudevident. Det originale plantemateriale begynder at blive brunt, og de ikke-transformerede oprindelig dannede skud bleges hvidt. De udvalgte kallus og skud er grønne og opin-positive.

Kontrolvæv fremstilles under anvendelse af A. tumefaciens celler indeholdende hjælper-plasmid pTiB6S3-SE eller pTiT37-SE og vektor pMON200. Udvalgt kallus transformeret med den ovenfor beskrevne EPSPS-vektor udviser resistens over for glyphosat ved koncentrationer mellem 5,0 og 20,0 mM. Kontrolvæv bleger og dør ved disse glyphosat-mængder.

Eksempel 8: Isolation af mutant EPSPS-gen fra E. coli

Celler af E. coli ATCC 11303 blev overført til medium A og inkuberet ved 37 °C.

Medium A

10 X MOPS medium	50 ml
50% glucoseopløsning	2 ml
100 mM aminomethylphosphonat	2 ml
Thiamin (5 mg/ml), pH = 7,4	1 ml
100 mM glyphosat (natriumsalt)	2 ml
Afioniseret vand til	500 ml

10 X MOPS medium:
Per 500 ml

1 M MOPS (209,3 g/l, pH = 7,4)	200 ml
1 M Tricin/89,6 g/l, pH = 7,4	20 ml
0,01 M $FeSO_4$, 7 H_2O (278,01 mg/100 ml)	5 ml
1,9 M NH_4Cl (550,18 g/500 ml)	25 ml
0,276 M K_2SO_4 (4,81 g/100 ml)	5 ml
0,5 mM $CaCl_2$, $2H_2O$ (7,35 mg/100 ml)	5 ml
0,528 M $MgCl_2$ (10,73 g/100 ml)	5 ml
5 M NaCl (292,2 g/l)	50 ml
0,5% L-methionin (500 mg/100 ml)	5 ml
mikronæringsstoffer*	5 µl

* Mikronæringsstoffer i 25 ml H2O	
$ZnSO_4$ (2,88 mg/ml)	25 µl
$MnCl_2$ (1,58 mg/ml)	250 µl
$CuSO_4$ (1,6 mg/ml)	25 µl
$CoCl_2$ (7,14 mg/ml)	25 µl
H_3BO_3 (2,47 mg/ml)	250 µl
$NH_4MO_7O_{24}$ (3,71 mg/ml)	25 µl

Efter en uge opnåedes en kultur, som kunne vokse hurtigt i nærværelse af høje koncentrationer af glyphosat i vækstmediet (10 mM eller derover). Analyse af EPSPS-aktiviteten i ekstrakterne af denne kultur og sammenligning af dens glyphosat-sensitivitet med vildtype E. coli afslørede, at den muterede organisme havde et ændret EPSPS. Glyphosat-sensitiviteten af EPSPS af mutantceller var væsentlig forskellig fra vildtypens. Denne bakteriemutant blev betegnet E. coli 13303 SM-1. Genet aroA, der koder for EPSPS fra denne bakteriemutant, blev isoleret på følgende måde:

Isolation af aroA-gen, der koder for EPSPS fra E. coli 11303 SM-1: DNA fra denne bakterie isoleredes (Marmur, J. (1961) J. Mol. Biol. 3:208-218). Southern hybridisation med E. coli K-12 aroA-gen (Rogers et al., 1983) som probe viste, at aroA-genet i bakteriemutanten sad på et 3,5 kb BglII-HindIII fragment. Dette fragment klonedes i vektoren pKC7 (Rao, R.N. & Rogers, S. G. (1979), gen F. 7-9-82) og det resulterende plasmid anvendtes for transformation af E. coli. Transformerede kolonier blev screenet for deres evne til at vokse under disse betingelser og viste sig at indeholde 3,5 kb BglII-HindIII indsætningen ved hybridisering med E. coli K-12 aroA-gen. Denne klon betegnedes pMON9538. Et NdeI-EcoRI fragment af denne indsætning, som indeholdt mere end 86% af aroA-genet fra bakteriemutanten klonedes i en ekspressionsvektor (pMON6012, et derivat af pMON6001, som beskrevet nedenfor), der udvikler et hybrid EPSPS kodningssekvens, som bærer E. coli K-12 aroA kodningssekvensen af E. coli K-12 og 11303 SM-1. Denne klon betegnedes pMON9540. EPSPS produceret ved dette hybrid aroA-gen bevarede sin glyphosat-tolerance, hvoraf fremgår, at den mutation-givende glyphosat-tolerance mod EPSPS i 11303 SM-1 var lokaliseret i aminosyrerne 53-427. E. coli mutant EPSPS-genet blev inkorporeret i plantetransformationsvektoren med og uden et chloroplast-transit-peptid på følgende måde.

Plasmid pMON6001 er et derivat af pBR327 (Soberon et al., 1980), som bærer E. coli K12 EPSPS-kodningssekvensen, udtrykt fra to tandem-kopier af en syntetisk fag λpL-promotor. Plasmid pMON6001 blev konstrueret påfølgende måde. Først blev pMON4 (Rogers et al., 1983) behandlet med ClaI, og 2,5 kb fragmentet blev indsat i en pBR327, som også er blevet spaltet med ClaI. Det dannede plasmid, pMON8, indeholder EPSPS-kodningssekvens, som læses i samme retning som β-lactamase-genet af pBR327.

For at konstruere pMON25, der er et derivat af pMON8 med unik restriktion-sendonuclease-steder, placeret nær ved E. coli EPSPS-kodningssekvensen, blev følgende trin gennemført. Et udladelsesderivat af pMON4 blev fremstillet ved spaltning med BstEII og religering. Det dannede plasmid, pMON7, savner 2 kb BstEII-fragment af pMON4. Dernæst blev 150 bp HinfI til NdeI-fragment, som koder for 5'-enden af EPSPS åben aflæsning, isoleret efter omsætning af pMON7 med NdeI og HinfI og elektroelution efterfulgt at elektroforetisk separation på en acrylamidgel. Dette stykke blev sat til det rensede 4,5 kb BamHI-NdeI-fragment af pMON8, som indeholder 3'-portionen af EPSPS-kodningssekvensen og en syntetisk linker med sekvensen:

5'-GATCCAGATCTGTTGTAAGGAGTCTAGACCATGG
GTCTAGACAACATTCCTCAGATCTGGTACCTTA

Det dannede plasmid pMON25 indeholder EPSPS-kodningssekvensen med forudgående unik BamHI og BglII-steder, et syntetisk ribosom bindingsæde og unikke XbaI-og NcoI-sæder, hvoraf sidstnævnte indeholder ATG-translationel initiator-signal af kodningssekvensen. For at konstrueret pMON6001, blev pMON25 behandlet med BamHI og blandet med et syntetisk DNA-fragment indeholdende en partiel fag λpL sekvens (Adams and Galluppi, 1986) indeholdende BamHI-koblingsender:

5'-ATCCTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAATACCATCGGCGGTGATACTGAGCACATCG
GATAGAGACCGCCACAACTGTATTTATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGCCTAG

Det dannede plasmid pMON6001 bærer to kopier af de syntetiske fag λpL promotorfragmenter, som direkte gentages i BamHI-sædet af pMON25 i den korrekte orientering til at fremkalde transskription af EPSPS-kodningssekvensen. BglII-HindIII fragmentet fra pMON6001 som indeholder E. coli K-12 aroA-genet blev indsat i en pEMBL18+ vektor, og et EcoRI-sæde blev indsat ved aa27 ved sæde-dirigeret mutagenese. Denne klon med det nye EcoRI-sæde blev benævnt pMON6530. NdeI-BglII fragmentet (som omfatter det nye EcoRI-sæde) fra pMON6530 blev klonet til NdeI-BglII behandlet pMON9540 til dannelse af pMON6531.

Plasmid pMON6012 er et simpelt derivat af pMON6001 skabt ved spaltning af pMON6001 og EcoRI, behandling med stort Klenow-fragment af E. coli DNA polymerase og ligering. Dette gav anledning til pMON 6010, som ikke indeholder EcoRI-spaltningssteder. Plasmid pMON6012 blev dernæst dannet ved behandling af pMON6010 med PvuII og indsætning af en syntetisk EcoRI-linker:

5'-CCGGAATTCCGG
GGCCTTAAGGCC

i det unikke PvuII-sæde nær enden af EPSPS-kodningssekvensen.

330 bp EcoRI-fragmentet af pMON9531 var klonet i M13 mp9 tildannelse af et nyt plasmid M8017. Sæde-dirigerende mutagenese udførtes til udføring af et BglII-sæde i styresekvensen netop 5' af chloroplast-transit-peptidet ved anvendelse af mutageneseprimeren.

5'-CCATTCTTGAAAGATCTAAAGATTGAGGA

Den opnåede mutageniserede klon er betegnet M13 M8020. BglII-EcoRI fragmentet blev klonet i BglII-EcoRI behandlet pMON530 til dannelse af pMON536. pMON530 er et pMON505-derivat (Horsch & Klee, 1985) med 35S-NOS kassetten, opnået ved overførsel af 2,3 kb StuI-HindIII fragmentet af pMON316 i pMON526. Plasmid pMON526 er et simpelt derivat af pMON505, hvori SmaI-sædet var fjernet ved behandling med XmaI, behandling med Klenow polymerase og ligering. Det dannede plasmid, pMON530 (fig. 2) bevarer egenskaberne af pMON505, og 35S-NOS ekspressionskassetten indeholder nu et unikt spaltningssæde for SmaI mellem promotoren og polyadenylationssignalerne. EcoRI-fragmentet indeholdende aroA-genet fra pMON6031 blev klonet i EcoRI-sædet af pMON536 til dannelse af pMON542.

BglII-EcoRI fragmentet af pMON9540 som koder for hybridet K12-SM1 EPSPS uden CTP blev klonet i BglII og EcoRI-sæderne af pMON530 til dannelse af pMON8078.

Transformation af tobaksceller ved hjælp af (konstrueret med CTP) som beskrevet i eksempel 3, gav glyphosat-resistens. Omvendt vil transformation af tobaksceller med pMON8078 (konstrueret uden CTP) ikke give glyphosat-resistens.

Eksempel 9: Gly^R kartoffelceller

Kartoffelskud-spidser af virus-fri Russet Burbank underdyrkes på medier indeholdende MS macro- og microsalte, 0,17 g/l natriumdihydrogenphosphat, 0,4 mg/l thiaminhydrochlorid, 0,1 g/l inositol, 3% saccharose, 1,5 g/l Gelrite™ (Kelco, Co.) ved pH = 5,6. Kulturer drykes ved 24C i en 16 timers photoperiode. Skud anvendes ca. 3 - 4 uger efter dyrkning af underkultur. Stængelled skæres i ca. 8 mm længder og spaltes på langs, hvorefter skærefladen ud-

stryges med den på Agrobacterium bærende binære vektor pMON542 og hjælper-plasmid pTiT37-SE, som var blevet udstrøget på en LB-agarplade og dyrkede nogle få dage. Stængelsektioner placeres med afskæring siden nedad på overfladen af mediet indeholdende MS-salte, MS organiske stoffer, 3% saccharose, 2,25 mg/l BA, 01186 mg/l NAA, 10 mg/l GA, 1,5 g/l Gelrite ved pH = 5,6. Efter 4 dage bliver stængelstykkerne overført til samme medium, men med carbenicillin ved 500 mg/l og kanamycin som det selektive middel ved 0 eller 300 mg/l. To uger efter podning føres plantestykkerne over på mediet med samme sammensætning, men uden NAA. Kanamycin ved 300 mg/l var tilstrækkelig til at forhindre kvælning og kallusering af de inficerede plantestykker uden at dræbe vævet. Det transformerede væv viser sig som små udvækster, sædvan ligvis på enderne af plantestykkerne. Transformeret væv udviser en væsentlig resistens over for glyphosat.

Eksempel 10: Gly^R solsikkeceller

Efterfølgende procedure anvendes til at opnå transformeret solsikkevæv og skud. Tumorer induceres på sterile solsikkestiklinger. Solsikkefrø overfladesteriliseres med 40% chlorvoks og sterilt destilleret skyllevand. Frøene spirer på et agarmedium indeholdende B5-salte, 0,5% saccharose og 0,8% agar. Syv dage gamle stiklinger podes med daggamle kulturer af Agrobacterium-stammer indeholdende pTiB6S3-SE ved at ridse stængelledet eller stikke det med en sprøjte og anvende en anden sprøjte til at indfære bakterier i såret. Tumorer dannes efter 2 - 3 uger. Tumorerne fjernes fra stiklingerne og dyrkes uafhængigt på MS-medium uden hormoner. Transformeret kallus og skud fås også ved en anden procedure. Frøoverfladesteriliseres og anbringes på det ovenfor beskrevne spiremedium. Spiringen udføres under belysning i 10 dage. Hypocotyl-segmenter, 2 - 3 mm udskæres og podes med Agrobacterium-stammer indeholdende bio-konstruktioner. Hypocotylerne samdyrkes i 2 dage på et medium indeholdende MS-salte og vitaminer, 5 g/l KNO_3, 100 mg/l isositol, 40 mg/l adenin-sulfat, 500 mg/l casaminosyre, 1

mg/l NAA, 1 mg/l BA, 0,1 mg/l GA3, 30 mg/l saccharose og 8 g/l agar. Efter samdyrkning placeres hypocotylerne på samme medium, men indeholdende 300 mg/l kanamycin og 500 mg/l carbenicillin. Efter 2 uger vil hypocotylerne podet med stammer indeholdende kanamycin-resistent gen producere kallus og regenerator på mediet indeholdende kanamycin, medens andre hypocotyler ikke gør det.

A. tumefaciens indeholdende binære vektorer pMON546 og hjælper-plasmid pTiB6S3-SE anvendes til at producere tumorer og kallus og regenererede planter. Tumorerne udviser tolerance over for glyphosat ved koncentrationer, som bleger og dræber kontroltumorer, der ikke indeholder glyphosat-resistent gen. Ikke-tumorøs kallus udviser ligeledes tolerance over for niveauer af glyphosat, der dræber kallus uden glyphosat-resistent gen. Transformerede solsikkeplanter demonstrerer tolerance over for glyphosat, sprøjtes ved koncentrationer, der dræber vild-type-planter.

Eksempel 11: Gly^R Petuniaplanter

Transformerede petuniaplanter fremstilles ved regeneration af de transformerede bladskiver fra eksempel 2 ved en fremgangsmåde beskrevet af Horsch et al 1985. De opnåede transformerede planter indeholdt pMON546 vektor, som er beskrevet ovenfor, der indeholder CaMV 35S promotor sammensmeltet til vild-type petunia EPSPS-genet.

Fire individuelle repræsentative transgeniske podninger blev udvalgt, dyrket og prøvet i prøverør som ovenfor beskrevet sammen med fire individuelle ikke-transformerede (vild-type) petuniastiklinger.

Planterne blev dyrket i et vækstmedium i et dyrkningskammer ved 26 °C med belysning i 12 timer pr. dag. Planterne blev gødet en gang om ugen med en opløselig gødning og vandet efter behov. Planterne blev sprøjtet ved en ens-

artet og reproducerbar mængde tilført herbicid ved anvendelse af et automatisk sprøjtningsapparat.

Den anvendte glyphosatopløsning blev målt som pund glyphosatsyreækvivalent pr. acre, blandet som glyphosat- isopropylaminsalt med et ionisk overfladeaktivt stof.

Fire individuelle vild-type (ikke-transformeret) petuniaplanter blev udvalgt som kontrolplanter. Fire individuelle transformerede planter indeholdende pMON546 vektor blev udvalgt efter kanamycin-resistens som beskrevet i Horsch et al. 1985.

Kontrolplanterne og de transformerede planter blev sprøjtet med isopropylaminsaltet af glyphosat i de påføringsmængder, som er anført i tabel 2 nedenfor, og forsøgsresultaterne er ligeledes sammenfattet i tabel 2.

Tabel 2

Planterespons overfor glyphosatspray

Plantetype	Glyphosat-dosis*	Visuel udseende
Kontrol	0,4 #/acre	planter udviste hurtig chlorosis og blegning, visnede og døde
Kontrol	0,8 #/acre	komplet død, planterne udviste meget hurtigt chlorosis og blegning, visnede og døde
Kimærisk EPSPS	0,8 #/acre	voksede godt, svag chlorosis af nye blade, som vokser med normal morphologi, planter synes sunde og begyndte at blomstre

* Syreækvivalent

Som angivet i tabel 2 blev kontrolplanterne dræbt, når de blev sprøjtet med 0,4 pund/acre af glyphosat. I modsætning hertil var de petuniaplanter, som var transformeret, sunde og levedygtige efter sprøjtning med 0,8 pund/acre. De transformerede planter er mere resistente over for glyphosat-påvirkning end ikke-transformerede kontrolplanter.

Eksempel 12: Gly^R tomatplanter

Transformerede tomatplanter af varianten VF36 produceres fra sterile stiklinger som beskrevet forneden. Sterile stiklinger af VF36 tomat dyrkes på vandagar. Hypocotyler og cotyledoner udskæres og dyrkes i 2 dage på MS-medium indeholdende B5 vitaminer, 30 g/l saccharose og 1 m g/l benzyladenin og 0,1 mg/l indoleddikesyre. Stiklingerne bliver derefter inficeret med A. tumefaciens vektor indeholdende det kimæriske EPSPS-gen, som er beskrevet i eksempel 2, ved neddypning i ca. 30 sekunder i en kultur af A. tumefaciens indeholdende det kimæriske EPSPS-syntasegen, som var blevet fortyndet til 107 bakterie/ml. Plantedele opnås ved afskæring af sektioner fra stiklingerne. Disse plantedele blottes tørt og inkuberes som beskrevet i eksempel 2 med den ændring, at mediet kun indeholder 10% standardkoncentrationer af MS-salte. Efter 2 dage af samdyrkning overføres plantedelene til selektivt medium indeholdende 100 µg/ml kanamycin. Transformerede tomatplanter dyrkes af plantedelene. Bladene fra disse planter prøves på glyphosat-resistens under anvendelse af den ovenfor beskrevne blad-kallusprøve. Tomatbladfragmenter fra planter indeholdende vektor alene (pMON200) eller pMON546 kimærisk EPSPS-gen inkuberes på kallusmedium som ovenfor beskrevet indeholdende 0,5 mM glyphosat. Efter 10 dage er kontrolbladene fuldstændig inhiberet og viser ikke noget tegn på kallus-vækst; bladene fra planter transformeret med den kimæriske EPSPS-genvektor producerede kallus.

Eksempel: Gly^R tobaksplanter

Transformerede tobaksplanter (Samsun varietet) blev fremstillet og dyrket ved fremgangsmåden i eksempel 4 under anvendelse af transformerede tobaksbladeskiver i stedet for transformerede petuniabladeskiver.

Tobaksplanter blev prøvet for glyphosat-resistens ved fremgangsmåden ifølge eksempel 5. Tobaksbladefragmenter fra planterne indeholdende vektor alene (pMON200) eller pMON546 kimærisk EPSPS-gen blev inkuberet på kallus-medium indeholdende 0,5 mM glyphosat.

Efter 10 dage var kontroltobaksbladene fuldstændig inhiberede og viste ikke noget tegn på kallus-vækst; bladene fra planterne transformeret med kimærisk EPSPS udviser glyphosat-resistens overfor tobaksplanter.

Eksempel 14: Isolation af Petunia EPSPS genomisk klon

For at isolere hele petunia EPSPS-genet blev biblioteket for petunia genomisk DNA konstrueret som beskrevet i eksempel 1-G. I korte træk blev kromosomal DNA fra MP4-G cellelinien behandlet med BamHI og klonet i en fagvektor, λMG14 til dannelse af et bibliotek. Som beskrevet i eksempel 1-G blev en fagklon λF7 isoleret, indeholdende et 4,8 kb BglII fragment, der var komplementært til pMON9531 cDNA-klon. For at isolere resten af genet screenet igen, idet der som probe anvendtes 1,6 kb cDNA indsætning fra pMON9556. Pladepåføring af biblioteket og hybridiseringsproceduren blev udført som beskrevet i eksempel 1-G. Adskillige positive signaler blev opnået. Et isolat blev udvalgt for yderligere analyse og blev betegnet som λF10 fagklon.

DNA fra λF10 blev behandlet separat med BamHI, BglII, EcoRI og HindIII. DNA blev hybridiseret med hak-translateret EPSPS-sekvenser fra

pMON9531 og pMON9556 i en Southern blot-procedure. Dette angiver, at de komplementære sekvenser fra λF10 var på 4,8 kb, 2,0 kb og 3,8 kb BglII-fragmenter. DNA-sekvensanalyse af disse fragmenter angiver, at de tre fragmenter tilsammen indeholder hele genet, der spænder over ca. 9 kb af petunia DNA og er afbrudt af syv introns (fig. 6).

Promotorfragmentet af EPSPS-genet indeholdt i den genomiske klon, λF10, kan anvendes til at udtrykke de kimæriske EPSPS cDNA eller genomiske sekvenser. Fragmenterne indeholdende introns kan også anvendes til at konstruere yderligere kimæriske EPSPS-gener til opnåelse af forhøjede mængder af mRNA.

Eksempel 15: Isolation af Arabidopsis thaliana genomisk klon

En Arabidopsis thaliana genomisk bank blev konstrueret ved kloning af overtræksfragtioneret (15-20 kb) MboI delvis behandlet DNA i BamHI skåret λEMBL3. Ca. 10000 plaques af fag fra dette bibliotek blev screenet med en hak-translateret petunia EPSPS-probe (pMON9556). En kraftigt hybridiseret plaque, E1, blev renset. Southern blots af EPSPS-probe til fag DNA præparat identificerede to fragmenter, som hybriserede meget kraftigt. Det første af disse var 1,0 kb HindIII-fragment og det andet var et 700 bp BamHI-fragment. Begge disse fragmenter blev subklonet i pUC119, og DNA-sekvensen af indsætningen blev bestemt.

Sekvensdata angav, at fagen ikke indeholdt Arabidopsis EPSPS-genet. Enzymet er kraftigt homologt til petunia-enzymet over arealet for hvilket sekvensen var tilgængelig. BamHI-fragmentet anvendtes som en hybridisationsprobe over for fagen, og Arabidopsis genomisk DNA til idendificering af restriktionsendonuclease-fragmenter egnede til klonin af hele genet. To BglII-fragmenter af 6,0 og 3,2 kb blev identificeret fra E1 fagklonen, der tilsammen indeholder hele EPSPS-genet. Fig. 6 sammenfat ter organisationen af Arabi-

dopsis-klonen og sammenligner den med organisationen af petunia EPSPS-genet.

DNA, der koder for aminoterminus af proteinet, er indenfor 6,0 kb BglII-fragmentet. Det nøjagtige translationsstartsæde kan bestemmes ved sammenligning af aminosyresekvensen, afledt af nucleotidsekvensen til petunia-enzymet. Sæde-dirigeret mutagenese kan derefter anvendes til at indføre et unikt EcoRI-sæde umiddelbart opefter mod translationsstartkodonen. Hele genet kan isoleres som et EcoRI-fragment. Dette EcoRI-fragment kan indsættes i udtrykkelsesvektoren pMON530, og den resulterende vektor anvendt til overudtrykke Arabidoposis EPSPS-enzymet i planter.

Eksempel 16: Isolation af tomat EPSP cDNA-klon

Et cDNA-bibliotek blev konstrueret fra RNA isoleret fra modne pistiller af tomat (Lycopersicum esculentum varietet VF36) ifølge Huynh et al. (in: DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, IRL Press, D. Glover ed., 1985) og Gubler og Hoffman (Gen 25: 263-269, 1985). Biblioteket blev overtrukket på E. coli stamme BNN102, og filterkopier blev udført. Filtrene blev hybridiseret med 1,9 kb BglII/ClaI fragment af pMON9563, der var mærket med ^{32}P (Feinberg og Vogelstein (Anal. Biochem. 132: 6-13, 1983). Hybridiseringsplakker isoleredes og genscreenes ved samme metode til påvisning af tilstedeværelsen af EPSPS cDNA. Den fulde længde tomat EPSPS cDNA var til stede på to EcoRI-fragmenter af 250 bp fragmentet klonedes EcoRI-sædet af pUC119 dannende pMON9596. 1700 bp fragmentet klonedes i pUC19 til dannelse af pMON9589. Indsætningen af pMON9596 blev sekventeret under anvendelse af dideoxysekventeringskit fra Amersham til bestemmelse af sekvensen, der omgiver startkodonen, for at lette mutagenese. Et BglII-sæde blev konstrueret 13 baser opstrøms fra startkodonet af pMON9596 ved fremgangsmåden ifølge Kunkel (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492, 1985) under anvendelse af kemisk syntetiseret oligonucleotid:

GCCATTTCTTGTGAAAAAGATCTTCAGTTTTTC

Indsætningen af det resulterende plasmid pMON9710 blev sekventeret til at verificere den korrekte mutation. 70 bp BglII/EcoRI fragment af pMON9710 blev indsat i pMON316, som var behandlet med BglII og EcoRI til dannelse af pMON9720. 1700 bp EcoRI-fragmentet af pMON9589 blev indsat i EcoRI-sædet af pMON9720 i den korrekte orientering til at rekonstituere EPSPS-kodningsregionen til opnåelse af pMON9721 (se fig. 7).

Dette plasmid blev indsat i A. tumefaciens celler, som indeholdt et hjælper-plasmid, pGV3111-SE. Hjælper-plasmidet koder for visse enzymer, som er nødvendig for at gøre det muligt at indsætte DNA fra pMON9721 i plante-cellekromosomer. Det indeholder også et kanamycin-resistent gen, der fungerer i bakterier. A. tumefaciens celler indeholdende pMON9721 anvendes ved plantetransformationseksperimenter til at producere glyphosat-resistente celler og planter som beskrevet i eksempel 12 ovenfor.

Eksempel 17: Isolation af Brasicca napus cDNA-klon

Total RNA blev isoleret fra Brassica napus (cultivar Westar) blomster på følgende måde. Blomsterne blev frosset i flydende nitrogen. Efter afdampning af nitrogenet blev blomsterne homogeniseret i ekstraktionspuffer (1% tris-isopropylnaphthalen-sulfonsyre, 6% p-aminosalicylsyre, 100 mM Tris-HCl, pH = 7,6 50 mM EGTA, pH = 7,5, 100 mM NaCl, 1% SDS og 50 mM 2-mercaptoethanol) og dernæst ekstraheret med lige volumen af en 1:1 blanding af phenol/chloroform. Nucleinsyrerne i den vandige fase blev udfældet med ethanol. Bundfaldet blev opløst i vand, og RNA blev fældet to gange med LiCl til en slutkoncentration på 2M. De færdige RNA-piller blev opløst i vand, og RNA blev udfældet med ethanol. PolyA RNA blev udvalgt ved oligdT-cellulosechromatografi. Udbyttet af polyA RNA var 1,0 µg/g af blomster.

Biblioteket blev konstrueret under anvendelse af polyA RNA fra Brassica napus blomster, og den anvendte metode er beskrevet i eksempel 16. Udbyttet i biblioteket var 90000 plaques/3 µg polyA RNA. Biblioteket blev overtrukket med en tæthed på 5000 plaques/plade. Fag-DNA blev overført til nitrocellulosefiltre. Filtrene blev hybridiseret under lav styrke i 35% formamid, 5 X SSC, 300 µg/ml tRNA, 0,1% SDS ved 37 °C. Indsætningen fra pMON9556 blev mærket med ^{32}P ved hak-translation og tilsat hybridiseringsopløsning ved 2 x 106 cpm/ml. Filtrene blev vasket i 2 x SSC ved stuetemperatur to gange i 15 minutter hver og en gang ved 37 °C i 30 minutter. Et antal positivt hybridiserigsfager blev opnået. Disse fager blev plukket og rescreenet to gange ved lav plaque-tæthed. Den positivt hybridiserede fag blev udvalgt, og de der indeholdt fuld længde B. napus EPSPS cDNA-klon valgtes til yderligere analyse. Den fulde længde B. napus EPSPS cDNA-klon vil blive modificeret og indsat i en planteekspressionsvektor, pMON530 til dannelse af kimærisk CaMV 35S/B.napus EPSPS-gen.

Eksempel 18: Petunia EPSPS chloroplast-optagning kræver CTP-sekvens

En fuld længde cDNA-klon af EPSPS fra P. hybrida blev opnået som beskrevet i eksempel 1. Denne cDNA-klon indeholder 27 nucleotider af 5'-ikke-translateret styresekvens, 1,5 kb, der koder for det 72 aminosyre-transitpeptid plus 444 aminosyrer af modent enzym og 0,4 kb af hele 3'-flankeringssekvens. Den fulde længde EPSPS cDNA blev klonet som et 2,1 kb BglII-SalI fragment i BamHI/SalI sæder af plasmid pGEMI til dannelse af plasmid pMON6140 og PGEM2 til dannelse af pMON6145. EPSPS-kodningsregionen transskriberes henholdsvis 5' til 3' fra T7 og SP6 promotorer.

Plasmid DNA (pMON6140 og pMON6145) indeholdende den fulde længde EPSPS cDNA blev lineariseret ved et unikt PvuI sæde beliggende i det 3'

ikke-translaterede område. Det lineariserede plasmid DNA blev transskriberet in vitro (ikke-kappet) med SP6 og T7 polymerase i det væsentlige som beskrevet i Krieg et al. 1984. Standardreaktionspufferen indeholdt 40 mM *Tris-HCl (pH = 7,9), 6 mM* $MgCl_2$, *10 mM dithiothreitol, 2 mM spermidin, 80U* RNasin ribonuclease-inhibitor, 0,5 mM hver af ATP, GTP, CTP og UTP, i et slutreaktionsvolumen af 100 µl. De endelige RNA-piller blev resuspenderet i 20 µl sterilt vand og opbevaret ved -80 °C. En standardtranslationsreaktion indeholdt 100 µl nuclease-behandlet kanin-reticulocytlysat, 5,7 µl 19-aminosyreblanding (minus methionin) ved 1 mM hver, 5,7 µl RNA (total RNA-transskriptioner afledt af 0,63 µg plasmid DNA), 16 µl RNasin (20U/µl) ribonuclease-inhibitor og 58,3 µl [^{35}S]methionin (14-15mCi/ml). Translationsreaktionen in vitro blev kørt ved 30 °C i 90 minutter. Translationsprodukterne blev opbevaret i frossen tilstand ved -80 °C.

Intakte chloroplaster blev isoleret salat (Latuca sativa, variant longifolia) ved centrifugering i Percoll/ficoll gradienter som modificeret af Bartlett et al (1982). De endelige piller af intakte chloroplaster blev suspenderet i 0,5 ml af sterilt 330 mM sorbitol i 50 mM Hepes-KOH, pH = 7,7, prøvet for chlorofyld (Arnon, 1949), og indstillet til en slutkoncentration af chlorofyld på 4 mg/ml (under anvendelse af sorbitol/Hepes). Udbyttet af intakte chloroplaster fra et enkelt salathoved var 3 - 6 mg chlorofyl. Disse chloroplaster blev anset for homogene baseret på fasekontrast og transmissionselektron-mikroskopi.

Et typisk 300 µl optagningsforsøg indeholdt 5 mM ATP, 8,3 mM ikke-mærket methionin, 322 mM sorbitol, 58,3 mM Hepes-KOH (pH = 8,0), 50 µl reticulocyt-lysat-translationsprodukter, og intakte chloroplaster fra L. sativa (200 µg chlorofyld). Optagningsblandingen blev forsigtigt vugget ved stuetemperatur (i 10 x 75 mm glasrør) direkte foran et fiberoptisk illuminatorsæt med maksimal intensitet (150 Watt pære). Alikvoter af optagningsblandingen (50 - 125 µl) blev fjernet på forskellige tidspunkter og fraktioneret over 100 µl siliconeolie-gradienter (i 150 µl polyethylenrør) ved centrifugering ved 11000 X g i 30

sekunder. Under disse betingelser vil intakte chloroplaster danne en pille under silicone-olielaget, og inkuberingsmediet (indeholdende reticulocyt-lysatet) flyder på overfladen. Efter centrifugering blev silicone-oliegradienten omgående frosset i tøris. Chloroplastpillerne blev derefter resuspenderet i 50 – 100 µl lysispuffer (10 mM Hepes-KOH pH = 7,5, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidin, 5 mM ε-amino-n-capronsyre og 30 µg/ml aprotinin) og centrifugeret ved 15000 X g i 20 minutter til pilletering af thylakoid-membraner. Den klare supernatant (stromal proteiner) fra dette spin og en alikvot af reticolocyt-lysat-inkubationsmediet fra hver optagningsforsøg blev blandet i samme rumfang 2X $NaDodSO_4$-PAGE prøvepuffer for elektrophorese (se nedenfor).

$NaDodSO_4$-PAGE udførtes ifølge Laemmli (1970) i 12% (w/v) acrylamid slabgeler (60 mm X 1,5 mm) med 3% (w/v) acrylamid stabel-geler (5 mm X 1,5 mm). Gelerne fikseredes i 30% methanol og 10% eddikesyre, tørredes under vakuum og optoges for direkte autoradiografi med Kodak XAR-5 røntgen.

Kvantisering af bånd på røntgenfilmen udførtes med et Hoefer GS-300 scanningsdensitometer tilsluttet en Spektra-Physics SP4100 recording/computer integrator.

For at verificere, at precursor EPSPS (+CTP) optages og omsættes af chloroplaster, blev den totale mængde translationsprodukter indeholdende [^{35}S]methionin-mærket pre-EPSPS inkuberet med frisk isoleret intakte chloroplaster fra L. sativa. pre-EPSPS (+CTP) blev hurtigt translokeret i chloroplaster og spaltet til modent EPSPS af M_r≈48 kDa. $NaDodSO_4$-PAGE autoradiografen afslørede forsvinding af precursor EPSPS fra inkubationsmedium, og den efterfølgende fremkomst af en lavmolekylær vægt moden form i chloroplast-fraktionen. En del af den modne EPSPS var også til stede i inkubationsmediet ved 15 minutter som følge af chloroplast-lyse. Efter optagningsbehandling af inkubationsblandingen med trypsin og chymotrypsin viste, at pre-EPSPS i inkubationsmediet var fuldstændig nedbrudt, medens det

modne EPSPS i chloroplast-fraktionen var fuldt beskyttet. Disse resultater viser, at EPSPS blev translokeret tværs over chloroplast-omhyldningen i det protease-utilgængelige rum. Yderligere angav subfraktionering af de reisolerede chloroplaster, at modent EPSPS blev lokaliseret i stromalfraktionen i modsætning til thylakoid-fraktion. Baseret på nucleotidsekvensen er den forudsagte molekylvægt for moden P. hybrida EPSPS 47790 dalton. Mr_48 kDa polypeptidet lokaliseret i den reisolerede chloroplast-fraktion sam-migrerede under NaDodSO4-PAGE med renset modent EPSPS af P. hybrida.

For at vise, at CTP kræves for optagningen, isoleres det modne enzym (manglende CTP) fra chloroplast-stroma efter et indledende 15 minutters optagningsforsøg. En blanding af stromal proteiner (indeholdende mærket modent enzym) blev fortyndet med ikke-mærkede reticulocyt-lysat og anvendt i et andet optagningsforsøg med intakte chloroplaster. Det modne EPSPS (manglende CTP) blev ikke translokeret i chloroplaster eller bundet til den ydre membran under en 15 minutter inkubering. Som kontrolforsøg fandtes, at optagningshastigheden for pre-EPSPS i chloroplaster var upåvirket af tilsætning af stromale proteiner til inkubationsblandingen. Af disse data kan det konkluderes, at CTP af EPSPS kræves for optagning af enzym i chloroplaster.

Eksempel 19: CTP af petunia EPSPS letter chloroplast-optagningen af heterologprotein

Følgende EPSPS-forsøg viser, at CTP kan rettes mod et heterologprotein til stroma-placering. 72-Amino-syre transit-peptid af EPSPS blev smeltet sammen til modent ssRUBISCO fra hvede. Modent hvede ssRUBISCO cDNA (Broglie et al. 1983) blev opnået som et SphI/PstI-fragment af ~0,6 kb. Dette SphI/PstI-fragment indeholder hele den modne hvede ssRUBISCO kodningsregion af 128 aminosyrer (begyndende ved N-terminal methionin) og 200 bp af den 3'-utranslaterede region. Det modne ssRUBISCO cDNA-fragment blev

smeltet bag P. hybrida EPSPS CTP cDNA-fragment. Denne sammensmeltning udførtes ved EcoRI/SphI-fragment af pMON6242 med hvede ssRUBISCO cDNA. Det konstruerede pMON6242 er et derivat af pMON6140 og indeholder P. hybrida EPSPS med et bio-consensus-spaltningssted for ssRUBISCO. Spaltningsstedet for pMON6140 EPSPS (ser-val-ala-thr-ala-gln/lys) ændredes til gly-gly-arg-val-ser-cys/met i pMON6242. Denne ændring introducerer et i ramme SphI-sted, som tillader CTP-omskiftning mellem ssRUBISCO og EPSPS. Konstruktionen pMON6242 er forudklonet i pGEM-2 og viser sig at give et kimærisk precursor-enzym, der transporteres i chloroplaster in vitro og proteolytisk behandles på korrekt måde.

EcoRI/SphI-fragment fra pMON6242 sammensmeltedes til SphI-sædet fra hvede ssRUBISCO og klonedes i plasmid pIBI til dannelse af pMON6149. In vitro trasskription/translation af pMON6149 gav et enkelt polypeptid af den forventede molekylvægt for fusionsproteinet (~23 kD). Chloroplast-importforsøg in vitro viste, at det kimære protein blev transporteret i stroma og proteolytisk spaltet til slutproduktet af ~15 dD (ssRUBISCO har en molekylvægt på 15 kD).

Disse resultater viser, at EPSPS CTP alene bevirker tilstrækkelig information til at rette et heterologt protein til chloroplast-stroma.

Referencer:

Adams, S. P. et al. (1983) J. Amer. Chem. Soc. 105: 661

Amrhein, N. et al. (1980) Naturwissenschafter 67: 356-357.

Arnon, D.I.. (1949) Plant Physiol. 24,1-15

Ausubel, F. et al (1980) Plant Mol. Bio. Newsletter 1: 26-32.

Barinaga, M. R. et al. (1981) "Methods for the Transfer of DNA, RNA and Protein to Nitrocellulose and Diazotized Paper Solid Supports", pub. by Schleicher and Schuell Inc., Keene NH.

Bartlett, S. G., Grossman, A.R. & Chua N.H. (1982) in Methods in Chloroplast Molecular Biology, Elsevier Biomedical Press, New York, pp 1081-1091.

Bevan, M. et al. (1983) Nature 304: 184.

Broglie, R. et al. (1983) Bio/Technology 1: 55-61.

Comai, L. et al. (1983) Science 221: 370-371.

Davis, R.W. et al. (1980) Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Labs, NY.

DeCleene, M. and DeLey, J. (1976) Bot. Review 42: 389-466.

DePicker, A. et al. (1982) J. Mol. Appl. Gen. 1: 561.

Ditta, G. et al (1980) Pro. Natl. Acad. Sci. Usa 77:7347

Edelman, M., Hallick, R. B. & Chua, N. H. (Elsevier Biomedical Press, New York), pp. 1081-1091.

Fraley, R. T. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803.

Goldberg, R. B. et al., (1981) Devel. Bio. 83: 201-217.

Hernalsteens, J. P. et al. (1985), EMBO Journal 3: 3039-3041.

Herrera-Estrella, L. et al. (1983) Nature 303: 209

Hooykaas-Van Slogteren, G.M.S. et al. (1984) Nature 311: 763-764.

Horsch, R. B. and Jones, G.E. (1980) In Vitro 16: 103-108.

Horsch, R. B. et al. (1985) Science 227: 1229-1231.

Horsch, R. B. and Klee, H. J. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4428-4432.

Hunkapiller, M.W. et al. (1983a) Methods Enzymol. 91: 399-413.

Hunkapiller, M.W. et al. (1983b) Methods Enzymol. 91: 486-493.

Huynh, T.V. et al, (1985) in DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, D. Glover (ed.), IRL Press, Oxford, England

Krieg, P.A. & Melton, D. A. (1984) Nucleic Acids Res. 12; 7057-7070.

Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685.

Lizardi, P.M. (1982) "Binding and Recovery of DNA and RNA using NA-45 DEAE Membrane." Schleicher and Schuell, Inc., Keene, NH.

Maniatis, T. et al. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs, NY.

Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977) P.N.A.S. U.S.A. 74: 560-564.

Meagher, R. B. et al. (1977) Virology 80: 362-375.

Messing, J. et al. (1981). Nucleic Res. 9: 309-321.

Messing, J. and J. Vieira (1982), Gene 19: 69-276.

Mousdale, D. M. and Coggins, J. R. (1984) Planta 160: 78-83.

Nafziger, E. D., et al (1984), Plant Physiol, 76, 571.

Mousdale, D. M. and Coggins, J. R. (1985) Planta 163: 241-294.

Rogers, S. G. et al. (1983) Appl. Envir. Microbio. 46: 37-43.

Rubin, J. et al. (1982) Plant Phys. 70: 833-839.

Scherer, et al. (1981) Developmental Bio.86: 438-447.

Schimke, R. T., ed. (1982) Gene Amplification, Cold Spring Harbor Labs.

Smart, C. C., et al (1985), J. Biol. Chem, 30, 16338.

Southern, E.M. (1975) J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Stalker, D. M. et al. (1985) J. Biol. Chem. 260: 4724-4728.

Steinrucken, H. and Amrhein, N. (1980) Biochem. & Biophys. Res. Comm. 94: 1207-1212.

Vieira, J. et al. (1982), Gene 19: 259-268.

Steinrucken, H. et al. (1985) Arch. Biochem. Biophys. (in press).

Young, R. A. and R. W. Davis. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci., USA 80: 1194-1198.

Zoller, M. M. et al, (1983), Methods Enzymol., 100, 468.

Patentkrav:

1. Kimærisk plantegen, som omfatter:

(a) en promotersekvens som forårsager transkription af EPSPS-genet i planteceller;

(b) en kodningssekvens som koder for et chloroplast-transit-peptid/5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat-syntase (EPSPS) fusions-polypeptid, hvilken chloroplast-transit-peptid, ved udtrykkelse i en plantecelle, tillader fusions-polypeptidet eller en enzymatisk aktiv del deraf at importere polypeptidet i en chloroplast af cellen; og

(c) en 3' utranslateret region som koder for et polyadenyleringssignal, der i planteceller fungerer ved at forårsage tilføjelse af polyadenylatnucleotider til 3'-enden af EPSPS mRNA; promotoren er heterolog i forhold til kodningssekvensen og i stand til at forårsage tilstrækkelig udtrykkelse af fusions-polypeptidet til at deraf udviklede planter og planteceller opnår en væsentlig grad af glyphosat-resistens.

2. Kimærisk gen ifølge krav 1, i hvilken promotersekvensen er en plantevirus-promotorsekvens.

3. Kimærisk gen ifølge krav 2, i hvilken promotorsekvensen er en promotorsekvens fra blomkålsmosaik-virus (CaMV).

4. Kimærisk gen ifølge krav 3, i hvilken promotorsekvensen er CaMV35S-promotorsekvensen.

5. Kimærisk gen ifølge krav 1, i hvilken kodningssekvensen koder for en mutant 5-enolpyruvylshikimat-3-phosphat-syntase (EPSPS).

6. Kimærisk gen ifølge krav 1, i hvilken EPSPS-kodningssekvensen koder for en EPSPS fra en organisme udvalgt fra gruppen, der består af bakterier, svampe og planter.

7. Kimærisk gen ifølge krav 1, i hvilken chloroplast-transit-peptidet er fra et plante-EPSPS-gen.

8. Klonings- eller ekspressionsvektor, der omfatter et kimærisk plantegen ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7.

9. Plantetransformationsvektor som omfatter et kimærisk gen ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7.

10. Glyphosat-resistent plantecelle, som omfatter et kimærisk plantegen ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7.

11. Glyphosat-resistent tomatplantecelle ifølge krav 10.

12. Glyphosat-resistent tobaksplantecelle ifølge krav 10.

13. Glyphosat-reistent rapsfrøolie-plantecelle ifølge krav 10.

14. Glyphosat-resistent hørplantecelle ifølge krav 10.

15. Glyphosat-resistent sojabønneplantecelle ifølge krav 10.

16. Glyphosat-resistent solsikkeplantecelle ifølge krav 10.

17. Glyphosat-resistent sukkerroeplantecelle ifølge krav 10.

18. Glyphosat-resistent alfalfaplantecelle ifølge krav 10.

19. Glyphosat-resistent bomuldsplantecelle ifølge krav 10.

20. Glyphosat-resistent kartoffelplantecelle ifølge krav 10.

21. Glyphosat-resistent plante, som er blevet regenereret fra en glyphosat-resistant plantecelle, hvilken plantecelle omfatter det kimæriske plantegen ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7.

22. Glyphosat-resistent plante ifølge krav 21 valgt fra gruppen, der består af sojabønne, bomuld, alfalfa, canola, hør, tomat, sukkerroe, solsikke, kartoffel, tobak, majs, hvede, ris og salat.

23. Glyphosat-resistent plante ifølge krav 21, som er blevet regeneret fra en glyphosat-resistent plantecelle ifølge et hvilket som helst af kravene 11-20.

24. Glyphsat-resistent plante ifølge et hvilket som helst af kravene 21-23, i hvilken planten er en tokimbladet plante.

25. Fremgangsmåde til fremstilling af en glyphosat-resistent plantecelle, hvilken fremgangsmåde omfatter transformering af plantecellen med plantetransformationsvektoren ifølge krav 9.

26. Fremgangsmåde til fremstilling af en glyphosat-resistent plante, hvilken fremgangsmåde omfatter:

(a) transformering af en plantecelle ved anvendelse af en Agrobacterium-transformationsvektor, som omfatter et kimærisk plantegen ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7, og

(b) regenerering af en glyphosat-resistent plante fra den transformerede plantecelle.

27. Fremgangsmåde til fremstilling af en glyphosat-resistent plante ifølge krav 26, i hvilken planten er en tokimbladet plante.

28. Plasmid pMON546 med ATCC accessionnummer 53213.

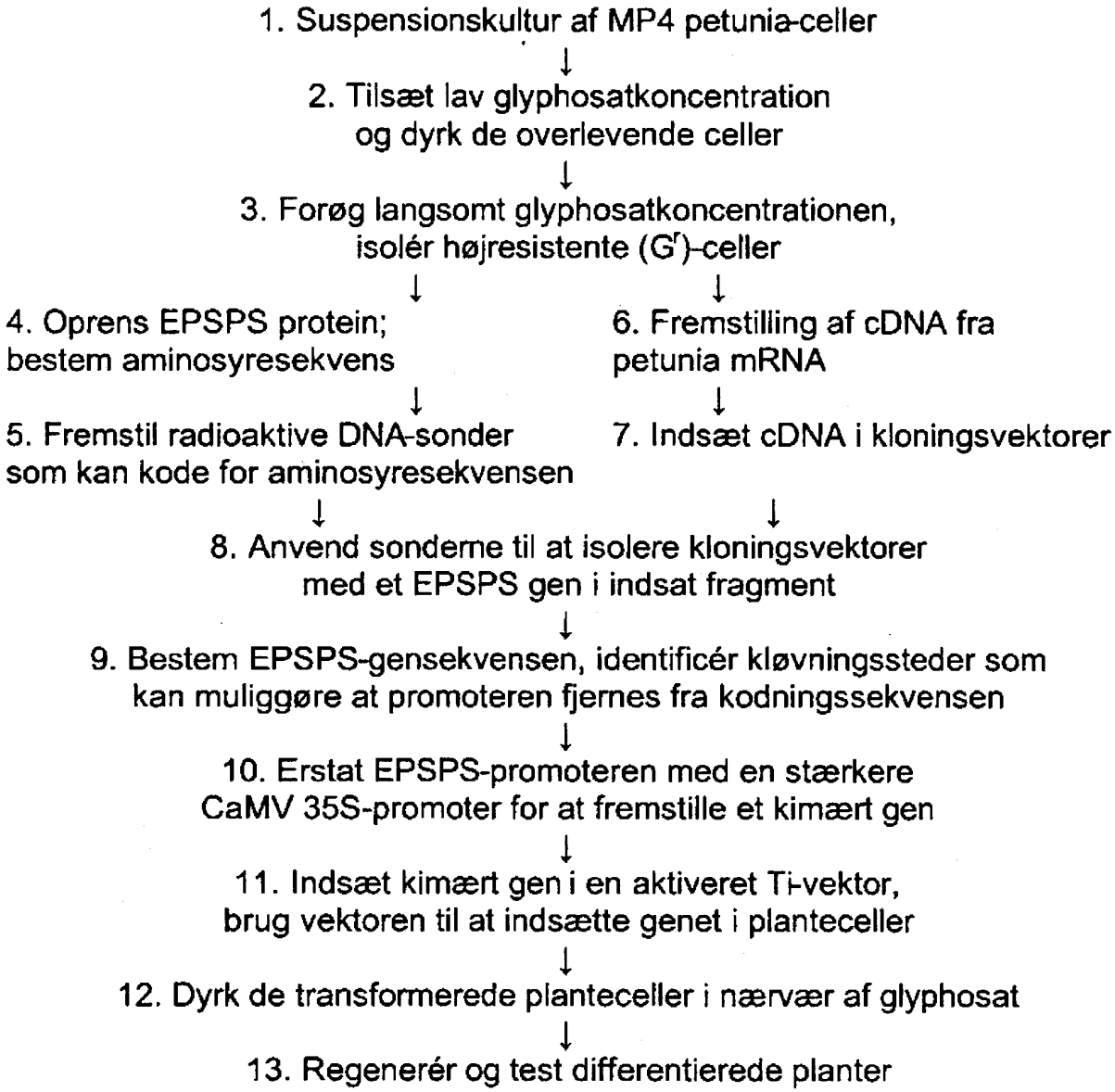

1. Suspensionskultur af MP4 petunia-celler
2. Tilsæt lav glyphosatkoncentration og dyrk de overlevende celler
3. Forøg langsomt glyphosatkoncentrationen, isolér højresistente (G^r)-celler
4. Oprens EPSPS protein; bestem aminosyresekvens
5. Fremstil radioaktive DNA-sonder som kan kode for aminosyresekvensen
6. Fremstilling af cDNA fra petunia mRNA
7. Indsæt cDNA i kloningsvektorer
8. Anvend sonderne til at isolere kloningsvektorer med et EPSPS gen i indsat fragment
9. Bestem EPSPS-gensekvensen, identificér kløvningssteder som kan muliggøre at promoteren fjernes fra kodningssekvensen
10. Erstat EPSPS-promoteren med en stærkere CaMV 35S-promoter for at fremstille et kimært gen
11. Indsæt kimært gen i en aktiveret Ti-vektor, brug vektoren til at indsætte genet i planteceller
12. Dyrk de transformerede planteceller i nærvær af glyphosat
13. Regenerér og test differentierede planter

Fig. 1

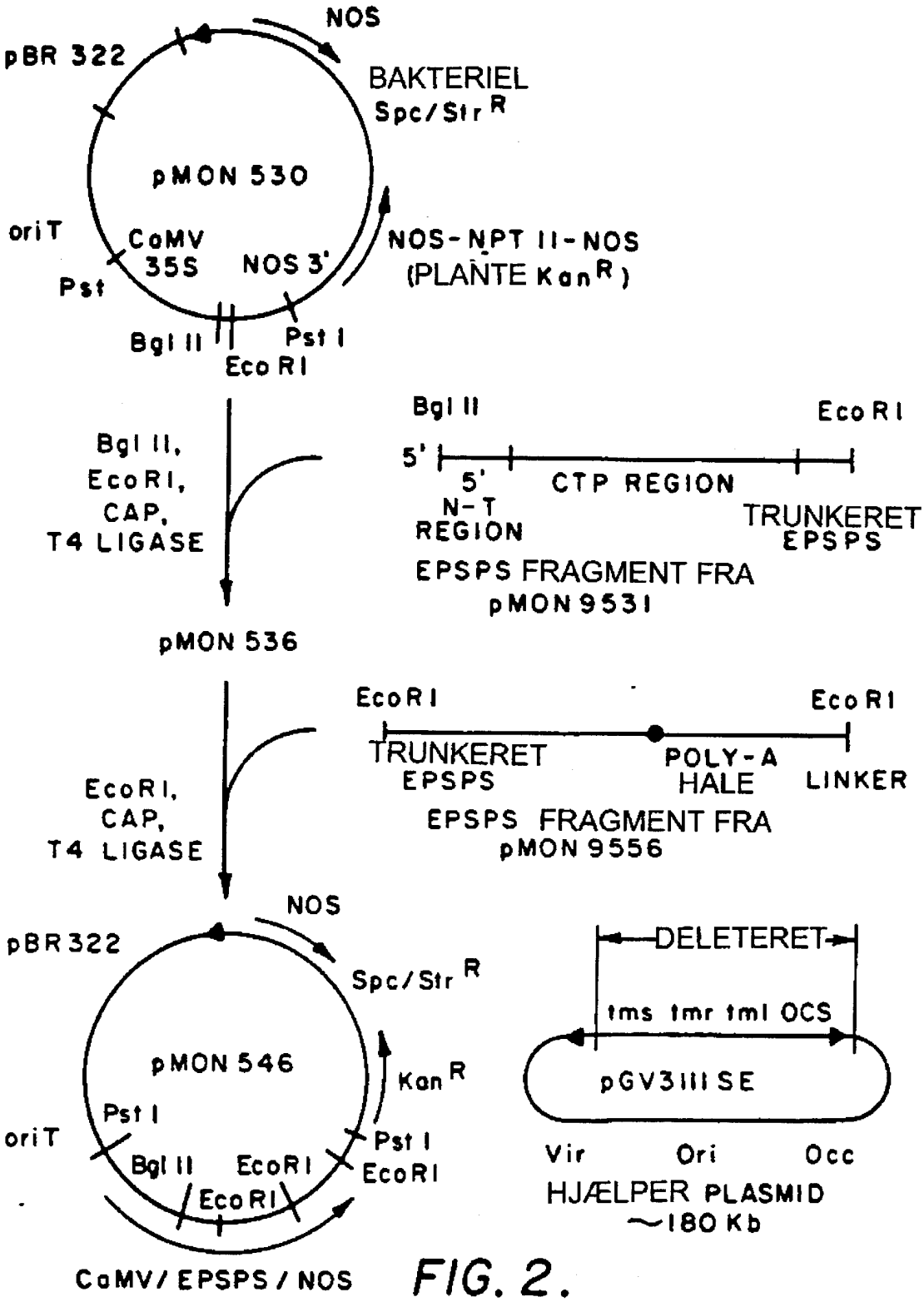

NOS
pBR 322
BAKTERIEL
Spc/Str R
pMON 530
oriT
CoMV
35S
NOS 3'
NOS-NPT II-NOS
(PLANTE Kan R)
Pst
Bgl II
Pst I
Eco RI
Bgl II,
EcoRI,
CAP,
T4 LIGASE
Bgl II
EcoRI
5'
5'
N-T
REGION
CTP REGION
TRUNKERET
EPSPS
EPSPS FRAGMENT FRA
pMON 9531
pMON 536
EcoRI
EcoRI
TRUNKERET
EPSPS
POLY-A
HALE
LINKER
EcoRI,
CAP,
T4 LIGASE
EPSPS FRAGMENT FRA
pMON 9556
NOS
pBR322
Spc/Str R
pMON 546
Kan R
oriT
Pst I
Bgl II
EcoRI
EcoRI
Pst I
EcoRI
CaMV/ EPSPS / NOS
DELETERET
tms tmr tml OCS
pGV3111 SE
Vir
Ori
Occ
HJÆLPER PLASMID
~180 Kb

FIG. 2.

DNA- OG AMINOSYRESEKVENS AF CHLOROPLAST TRANSIT-PEPTIDET (CPT) FRA PETUNIA EPSPS-GENET

```
  1  GAATTCCCTCAATCTTTACTTTCAAGAATGGCACAAATTAACAACATGGCTCAAGGGATA   60
                                MetAlaGlnIleAsnAsnMetAlaGlnGlyIle

 61  CAAACCCTTAATCCCAATTCCAATTTCCATAAACCCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGTTTT  120
     GlnThrLeuAsnProAsnSerAsnPheHisLysProGlnValProLysSerSerSerPhe

121  CTTGTTTTTGGATCTAAAAAACTGAAAAATTCAGCAAATTCTATGTTGGTTTTGAAAAAA  180
     LeuValPheGlySerLysLysLeuLysAsnSerAlaAsnSerMetLeuValLeuLysLys

181  GATTCAATTTTTATGCAAAAGTTTTGTTCCTTTAGGATTTCAGCATCAGTGGCTACAGCA  240
     AspSerIlePheMetGlnLysPheCysSerPheArgIleSerAlaSerValAlaThrAla

241  CAG
     Gln
```

FIG. 3

Petunia EPSP Synthase cDNA

```
1     GAATTCCCTCAATCTTTACTTTCAAGAATGGCACAAATTAACAACATGGCTCAAGCGATA      60
                                 MetAlaGlnIleAsnAsnMetAlaGlnGlyIle

61    CAAACCCTTAATCCCAATTCCAATTTCCATAAACCCCAAGTTCCTAAATCTTCAAGTTTT     120
GlnThrLeuAsnProAsnSerAsnPheHisLysProGlnValProLysSerSerPhe

121   CTTGTTTTTGGATCTAAAAAACTGAAAAATTCAGCAAATTCTATGTTGCTTTTGAAAAAA     180
LeuValPheGlySerLysLysLeuLysAsnSerAlaAsnSerMetLeuValLeuLysLys

181   GATTCAATTTTTATGCAAAAGTTTTGTTCCTTTACGATTTCAGCATCAGTGGCTACAGCA     240
AspSerIlePheMetGlnLysPheCysSerPheArgIleSerAlaSerValAlaThrAla
   |--->mature EPSPS
241   CAGAAGCCTTCTGAGATAGTGTTGCAACCCATTAAAGAGATTTCAGGCACTGTTAAATTG     300
GlnLysProSerGluIleValLeuGlnProIleLysGluIleSerGlyThrValLysLeu

301   CCTGGCTCTAAATCATTATCTAATAGAATTCTCCTTCTTGCTGCCTTATCTGAACGAACA     360
ProGlySerLysSerLeuSerAsnArgIleLeuLeuLeuAlaAlaLeuSerGluGlyThr

361   ACTGTGCTTGACAATTTACTAAGTAGTGATGATATTCATTACATGCTTGGTGCCTTGAAA     420
ThrValValAspAsnLeuLeuSerSerAspAspIleHisTyrMetLeuGlyAlaLeuLys

421   ACACTTGGACTGCATCTACAAGAAGATAGTGCAAAGCAACGAGCTGTTGTTGCAAGGTTGT     480
ThrLeuGlyLeuHisValGluGluAspSerAlaAsnGluArgAlaValValGluGlyCys

481   GGTGGGCTTTTCCCTGTTGCTAAAGAGTCCAAGCAACAAATTCAACTGTTCCTTGGAAAT     540
GlyGlyLeuPheProValGlyLysGluSerLysGluGluIleGlnLeuPheLeuGlyAsn

541   GCAGGAACAGCCATGCGCCCACTAACAGCAGCAGTTACTGTAGCTGGTGCAAATTCAAGG     600
AlaGlyThrAlaMetArgProLeuThrAlaAlaValThrValAlaGlyGlyAsnSerArg

601   TATGTACTTGATGGAGTTCCTCGAATGAGAGAGAGACCAATTAGTGATTTGGTTGATGCT     660
TyrValLeuAspGlyValProArgMetArgGluArgProIleSerAspLeuValAspGly

661   CTTAAACAGCTTGGTGCAGACGTTGATTGTTTCCTTGGTACGAAATGTCCTCCTGTTCGA     720
LeuLysGlnLeuGlyAlaGluValAspCysPheLeuGlyThrLysCysProProValArg

721   ATTGTCAGCAAGGGACGTCTTCCTGGAGGGAAGCTCAAGCTCTCTGGATCCATTAGCACC     780
IleValSerLysGlyGlyLeuProGlyGlyLysValLysLeuSerGlySerIleSerSer

781   CAATACTTGACTGCTCTGCTTATGGCTGCTCCACTGGCTTTAGGAGATGTGGAGATTGAA     840
GlnTyrLeuThrAlaLeuLeuMetAlaAlaProLeuAlaLeuGlyAspValGluIleGlu

841   ATCATTGACAAACTAATTAGTGTACCTTATGTCGAGATGACATTGAAGTTGATGGAGCGA     900
IleIleAspLysLeuIleSerValProTyrValGluMetThrLeuLysLeuMetGluArg

901   TTTGGTATTTCTGTGGAGCACAGTAGTAGCTGGGACAGGTTCTTTCTCCGAGGAGGTCAG     960
PheGlyIleSerValGluHisSerSerSerTrpAspArgPhePheValArgGlyGlyGln

961   AAATACAAGTCTCCTGGAAAAGCTTTTGTCGAAGGTGATGCTTCAAGTGCTAGCTACTTC    1020
LysTyrLysSerProGlyLysAlaPheValGluGlyAspAlaSerSerAlaSerTyrPhe

1021  TTGGCTGGTGCAGCAGTCACAGGTGGAACTATCACTGTTGAAGCTTGTGGGACAAACAGT    1080
LeuAlaGlyAlaAlaValThrGlyGlyThrIleThrValGluGlyCysGlyThrAsnSer

1081  TTACAGGGCGATGTCAAATTTGCTGAGCTACTTGAAAAAATGGGAGCTGAAGTTACGTGG    1140
LeuGlnGlyAspValLysPheAlaGluValLeuGluLysMetGlyAlaGluValThrTrp

1141  ACAGAGAACAGTGTCACAGTCAAAGGACCTCCAACGACTTCTTCTGGGAGGAAGCATTTG    1200
ThrGluAsnSerValThrValLysGlyProProArgSerSerSerGlyArgLysHisLeu

1201  CGTGCCATTGATGTGAACATGAATAAAATGCCTGATGTTGCCATGACACTTGCTGTTGTT    1260
ArgAlaIleAspValAsnMetAsnLysMetProAspValAlaMetThrLeuAlaValVal

1261  GCACTTTATGCTGATGGTCCCACAGCTATAAGAGATGTTGCTAGCTGGAGAGTCAAGGAA    1320
AlaLeuTyrAlaAspGlyProThrAlaIleArgAspValAlaSerTrpArgValLysGlu

1321  ACTGAGCGCATGATCGCCATATGCACAGAACTTAGGAAGTTAGGAGCAACCGTTGAAGAA    1380
ThrGluArgMetIleAlaIleCysThrGluLeuArgLysLeuGlyAlaThrValGluGlu

1381  GGACCAGACTACTGCATAATCACCCCACCGGAGAAACTAAATGTGACCGATATTGATACA    1440
GlyProAspTyrCysIleIleThrProProGluLysLeuAsnValThrAspIleAspThr

1441  TACGATGATCACACGAATGCCATGGCTTTTTCTCTTGCTGCTTGTGCAGATGTTCCCGTC    1500
TyrAspAspHisArgAsnAlaMetAlaPheSerLeuAlaAlaCysAlaAspValProVal

1501  ACCATCAATGACCCTGGCTGCACGCGGAAAACCTTCCCTAACTACTTTGATGTACTTCAG    1560
ThrIleAsnAspProGlyCysThrArgLysThrPheProAsnTyrPheAspValLeuGln

1561  CAGTACTCCAAGCATTGAACCGCTTCCCTATATTGCAGAATGTAAGTAAGAATATGTGAA    1620
GlnTyrSerLysHisEnd

1621  GAGTTTAGTTCTTCTACAAGACAGGCTACGACTGCCTGGTATCAGAACGCACAATGGGTTC    1680

1681  CATTTCAGTTCAGAAGCGCATTCCAAGCCTTCGAACTCTTTACTTATTTCCGACTGATGA    1740

1741  AATGTATTTGTTAGAGTTGAGCTTCTTTTTGTCTTTAAGGAATGTACACTAATAGAGTTA    1800

1801  AGAATTACTAGTATGGGCCAGTGTAAGGAGTACTATTACTCTTTGCTTATTTTATTGATT    1860

1861  GAGTTTTGTCAAGGATCTGGCTTTGTCAAGAATTACTGCTTAATTTTATTCACAATCTCA    1920

1921  TGTGTCTAAATGAAATTGTTTGATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAATTC    1978
```

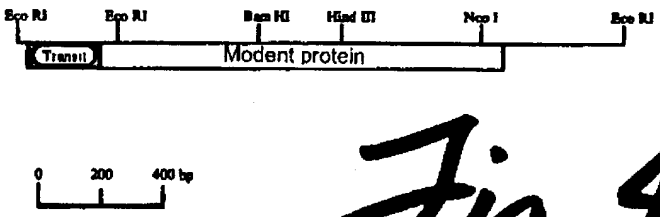


Fig. 4

DK 175922 B1

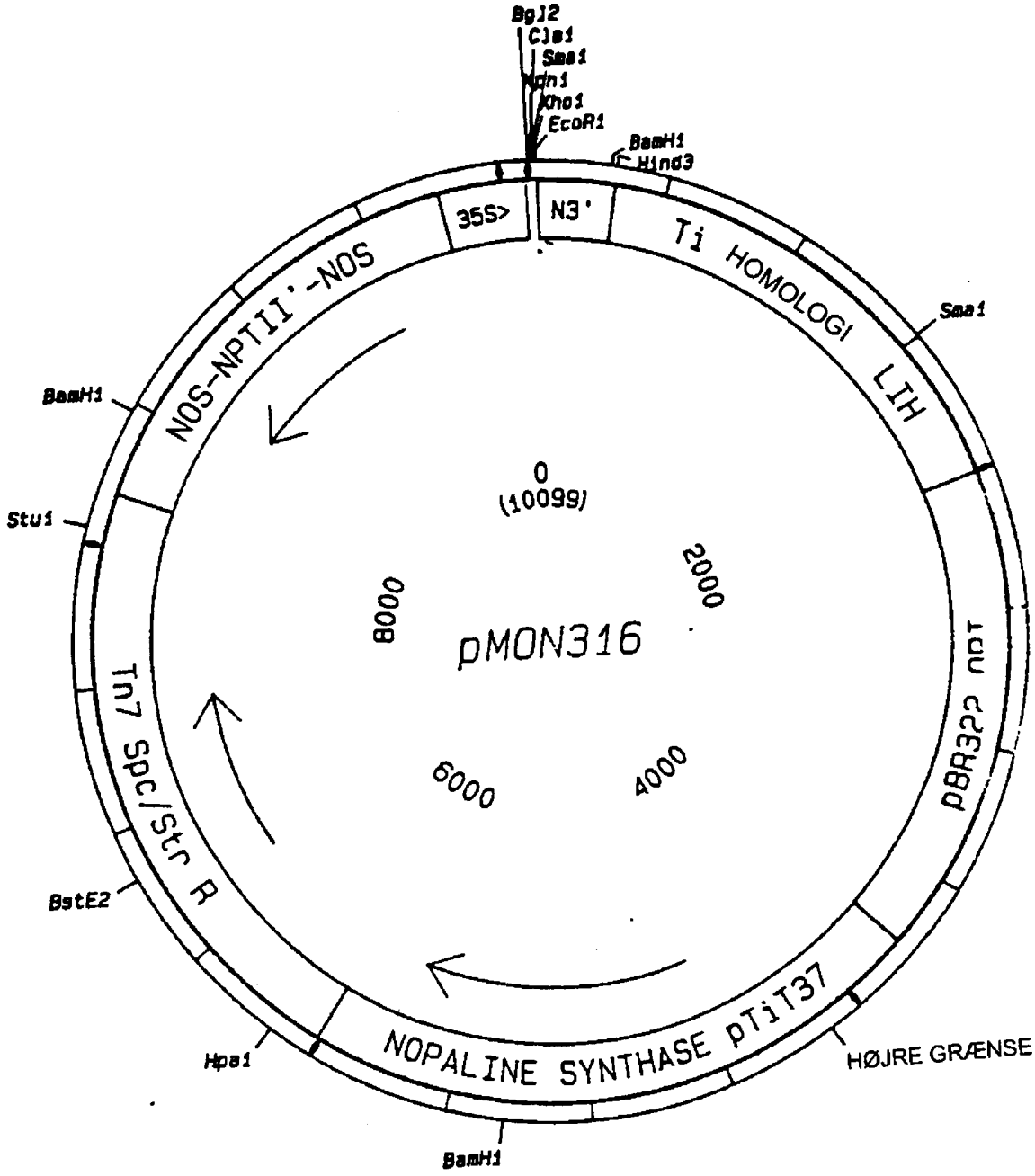

BglI2
Cla1
Sma1
Xho1
EcoR1
BamH1
Hind3
35S>
N3'
Ti HOMOLOGI
LIH
Sma1
pBR322 ORI
HØJRE GRÆNSE
NOPALINE SYNTHASE pTiT37
BamH1
Hpa1
BstE2
Tn7 Spc/Str R
Stu1
BamH1
NOS-NPTII'-NOS
0
(10099)
2000
4000
6000
8000
pMON316

Fig. 5

Sammenligning af Petunia og Arabidopsis EPSPS-synthase-gener

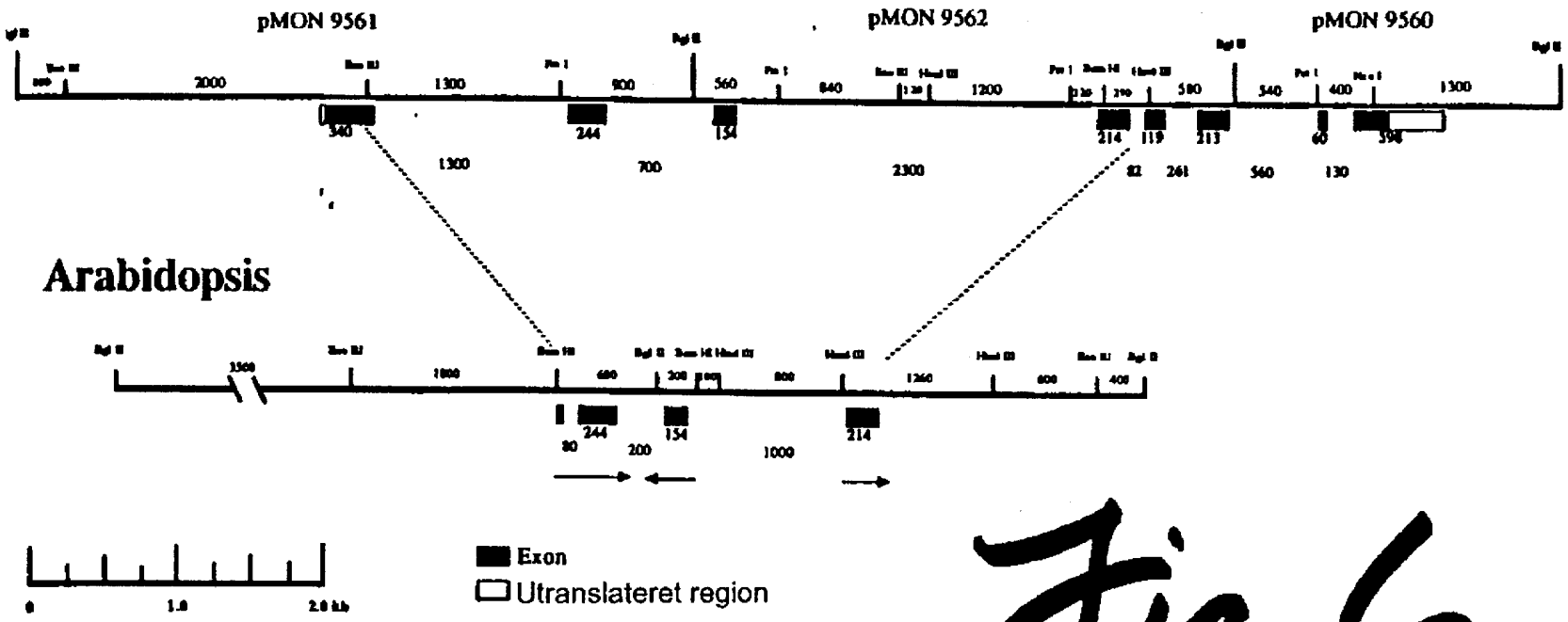


Fig. 6

DK 175922 B1

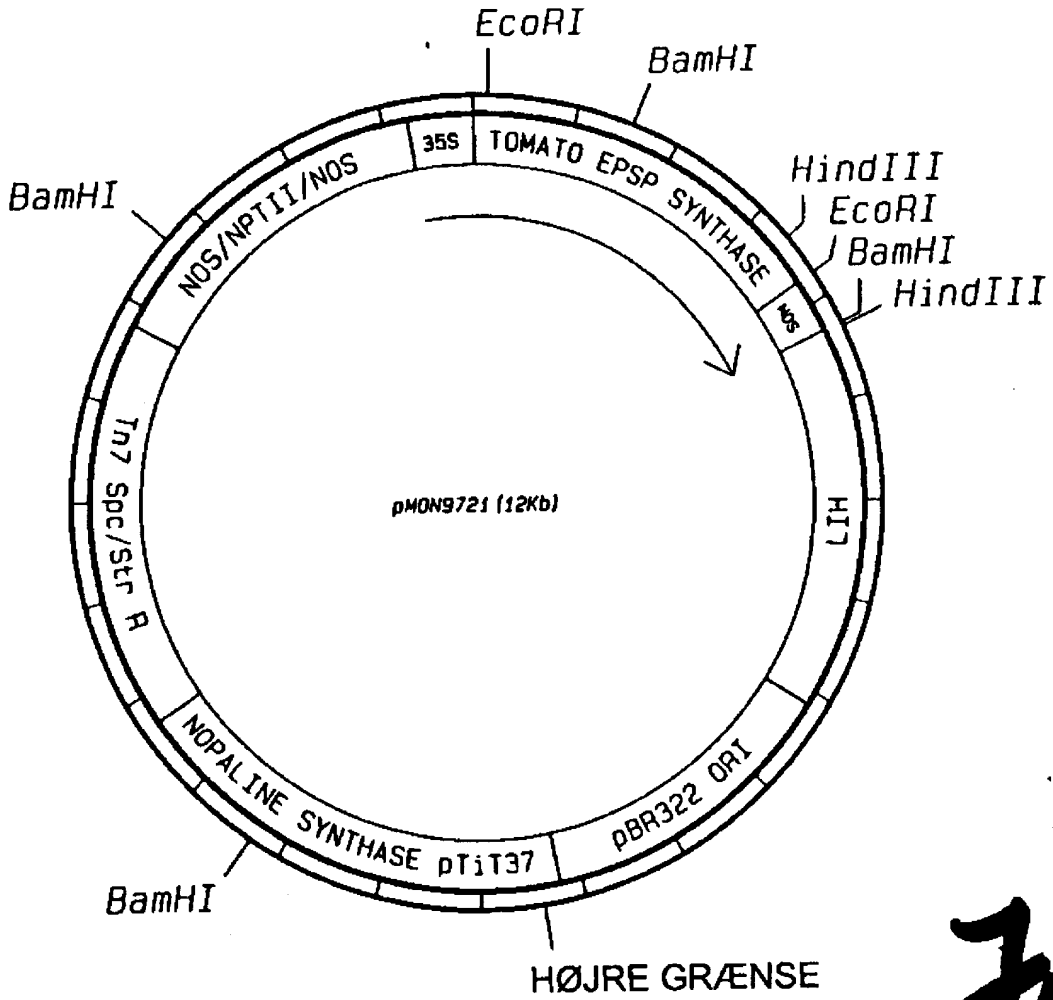


Fig. 7

DK 175922 B1