(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 95 917 564 T1** 2009.11.12

(12) # Veröffentlichung der Patentansprüche

der europäischen Patentanmeldung mit der
(97) Veröffentlichungsnummer: **0 763 058**
in deutscher Übersetzung (Art. II § 2 Abs. 1 IntPatÜG)
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/04589**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 917 564.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/028423**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.04.1995**
(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.10.1995**
(97) Veröffentlichungstag
der europäischen Anmeldung: **19.03.1997**
(46) Veröffentlichungstag der Patentansprüche
in deutscher Übersetzung: **12.11.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/29*** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

227360	**13.04.1994**	**US**
310912	**22.09.1994**	**US**

(71) Anmelder:
Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Parkville, Victoria, AU; The General Hospital Corp., Boston, Mass., US; The Regents of the University of California, Oakland, Calif., US; The United States of America as represented by the Department of Agriculture, Washington, D.C., US

(74) Vertreter:
Marks & Clerk (Luxembourg) LLP, Luxembourg, LU

(72) Erfinder:
AUSUBEL, Frederick M., Newton, MA 02161, US; STASKAWICZ, Brian J., Castro Valley, CA 94546, US; BENT, Andrew F., Urbana, IL 61801, US; DAHLBECK, Douglas, Castro Valley, CA 94546, US; KATAGIRI, Fumiaki, Somerville, MA 02144, US; KUNKEL, Barbara N., St. Louis, MO 63112, US; MINDRINOS, Michael N., Boston, MA 02215, US; YU, Guo-Liang, Darnestown, MD 20878, US; BAKER, Barbara, Richmond, CA 94805, US; ELLIS, Jeffrey, Weetangera 2614, AU; SALMERON, John, Hillsborough, NC 27278, US

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **-i(RPS)GENFAMILIE, PRIMERS, SONDEN UND NACHWEISMETHODEN**

(57) Hauptanspruch: Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' GGNATGGGNGGNNTNGGNAARACNAC 3', [SEQ. ID NO: 158], wobei N A, T, G oder C ist; und R A oder G ist.

Patentansprüche

1. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' GGNATGGGNGGNNTNGGNAARACNAC 3', [SEQ. ID NO: 158], wobei N A, T, G oder C ist; und R A oder G ist.

2. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' NARNGGNARNCC 3', [SEQ. ID NO: 169], wobei N A, T, G oder C ist; und R A oder G ist.

3. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' NCGNGWNGTNAKDAWNCGNGA 3', [SEQ. ID NO: 159], wobei N A, T, G oder C ist; W A oder T ist; D A, G oder T ist; und K G oder T ist.

4. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' GGWNTBGGWAARACHAC 3', [SEQ. ID NO: 160], wobei N A, T, G oder C ist; R G oder A ist; B C, G oder T ist; H A, C oder T ist; und W A oder T ist.

5. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' TYGAYGAYRTBKRBRA 3', [SEQ. ID NO: 163], wobei R G oder A ist; B C, G oder T ist; D A, G oder T ist; Y T oder C ist; und K G oder T ist.

6. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' TYCCAVAYRTCRTCNA 3', [SEQ. ID NO: 164], wobei N A, T, G oder C ist; R G oder A ist; V G oder C oder A ist; und Y T oder C ist.

7. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' GGWYTBCCWYTBGCHYT 3', [SEQ. ID NO: 170], wobei B C, G oder T ist; H A, C oder T ist; W A oder T ist; und Y T oder C ist.

8. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' ARDGCVARWGGVARNCC 3', [SEQ. ID NO: 171], wobei N A, T, G oder C ist; R G oder A ist; W A oder T ist; D A, G oder T ist; und V G, C oder A ist.

9. Im wesentlichen reines Oligonucleotid, umfassend die Sequenz:
5' ARRTTRTCRTADSWRAWYTT 3', [SEQ. ID NO: 174], wobei R G oder A ist; W A oder T ist; D A, G oder T ist; S G oder C ist; und Y C oder T ist.

10. Rekombinantes Pflanzengen, umfassend die DNA-Sequenz:
5' GGNATGGGNGGNNTNGGNAARACNAC 3', [SEQ. ID NO: 158], wobei N A, T, G oder C ist; und R A oder G ist.

11. Gen nach Anspruch 10, weiterhin umfassend die Sequenz:
5' NARNGGNARNCC 3', [SEQ. ID NO: 169], wobei N A, T, G oder C ist; und R A oder G ist.

12. Gen nach Anspruch 11, weiterhin umfassend die Sequenz:
5' NCGNGWNGTNAKDAWNCGNGA 3', [SEQ. ID NO: 167], wobei N A, T, G oder C ist; W A oder T ist; D A, G oder T ist; und K G oder T ist.

13. Rekombinantes Pflanzengen, umfassend eine Kombination von beliebigen zwei oder mehreren Sequenzen nach den Ansprüchen 10, 11 und 12.

14. Im wesentlichen reines Pflanzenpolypeptid, umfassend die Aminosäuresequenz:
Gly Xaa_1 Xaa_2 Gly Xaa_3 Gly Lys Thr Thr Xaa_4 Xaa_5, [SEQ. ID NO: 191],
wobei Xaa_1 Met oder Pro ist; Xaa_2 Gly oder Pro ist; Xaa_3 Ile, Leu oder Val ist; Xaa_4 Ile, Leu oder Thr ist; und Xaa_5 Ala oder Met ist.

15. Im wesentlichen reines Pflanzenpolypeptid, umfassend die Aminosäuresequenz:
Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Leu Xaa_4 Xaa_5 Xaa_6 Asp Asp Xaa_7 Xaa_8, [SEQ. ID NO: 192],
wobei Xaa_1 Phe oder Lys ist; Xaa_2 Arg oder Lys ist; Xaa_3 Ile, Val oder Phe ist; Xaa_4 Ile, Leu oder Val ist; Xaa_5 Ile oder Leu ist; Xaa_6 Ile oder Val ist; Xaa_7 Ile, Leu oder Val ist; und Xaa_8 Asp oder Trp ist.

16. Im wesentlichen reines Pflanzenpolypeptid, umfassend die Aminosäuresequenz:
Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4 Xaa_5 Thr Xaa_6 Arg, [SEQ. ID NO: 193],
wobei Xaa_1 Ser oder Cys ist; Xaa_2 Arg oder Lys ist; Xaa_3 Phe, Ile oder Val ist; Xaa_4 Ile oder Met ist; Xaa_5 Ile, Leu oder Phe ist; Xaa_6 Ser, Cys oder Thr ist.

17. Im wesentlichen reines Pflanzenpolypeptid, umfassend die Aminosäuresequenz:
Gly Leu Pro Leu Xaa_1 Xaa_2 Xaa_3 Xaa_4, [SEQ. ID NO: 194],
wobei Xaa_1 Thr, Ala oder Ser ist; Xaa_2 Leu oder Val ist; Xaa_3 Ile, Val oder Lys ist; und Xaa_4 Val oder Thr ist.

18. Im wesentlichen reines Pflanzenpolypeptid, umfassend die Aminosäuresequenz:
Xaa_1 Xaa_2 Ser Tyr Xaa_3 Xaa_4 Leu, [SEQ. ID NO: 195],
wobei Xaa_1 Lys oder Gly ist; Xaa_2 Ile oder Phe ist; Xaa_3 Asp oder Lys ist; und Xaa_4 Ala, Gly oder Asn ist.

19. Verfahren zum Isolieren eines Krankheitsresistenz-Gens oder Fragments davon aus einer Pflanzenzelle, umfassend:
(a) Bereitstellen einer Probe von Pflanzenzellen-DNA;
(b) Bereitstellen eines Paars von Oligonucleotiden

mit Sequenzhomologie zu einer konservierten Region eines RPS-Krankheitsresistenz-Gens;
(c) Vereinigen des Paars von Oligonucleotiden mit der Pflanzenzellen-DNA-Probe unter Bedingungen, geeignet für Polymerase-Kettenreaktion-vermittelte DNA-Amplifikation; und
(d) Isolieren des amplifizierten Krankheitsresistenz-Gens oder Fragments davon.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die Amplifikation unter Verwendung einer reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion ausgeführt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 19, wobei die reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion RACE ist.

22. Verfahren zum Identifizieren eines Pflanzenkrankheitsresistenz-Gens in einer Pflanzenzelle, umfassend:
(a) Bereitstellen einer Zubereitung von Pflanzenzellen-DNA;
(b) Bereitstellen einer nachweisbar markierten DNA-Sequenz mit Homologie zu einer konservierten Region eines RPS-Gens;
(c) Inkontaktbringen der Zubereitung von Pflanzenzellen-DNA mit der nachweisbar markierten DNA-Sequenz unter Hybridisierungsbedingungen, wobei Nachweis von Genen mit 50% oder mehr Sequenzidentität bereitgestellt wird; und
(d) Identifizieren eines Krankheitsresistenz-Gens durch seine Assoziation mit der nachweisbaren Markierung.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die DNA-Sequenz gemäß dem Verfahren nach Anspruch 19 hergestellt wird.

24. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Zubereitung von Pflanzenzellen-DNA aus einem Pflanzengenom isoliert wird.

25. Verfahren zum Isolieren eines Krankheitsresistenz-Gens aus einer rekombinanten Pflanzenzellenbibliothek, umfassend:
(a) Bereitstellen einer rekombinanten Pflanzenzellenbibliothek;
(b) Inkontaktbringen der rekombinanten Pflanzenzellenbibliothek mit einem nachweisbar markierten Genfragment, hergestellt gemäß dem Verfahren nach Anspruch 19, unter Hybridisierungsbedingungen, wobei Nachweis von Genen mit 50% oder mehr Sequenzidentität bereitgestellt wird; und
(c) Isolieren eines Bestandteils eines Krankheitsresistenz-Gens durch seine Assoziation mit der nachweisbaren Markierung.

26. Verfahren zum Isolieren eines Krankheitsresistenz-Gens aus einer rekombinanten Pflanzenzellenbibliothek, umfassend:
(a) Bereitstellen einer rekombinanten Pflanzenzellenbibliothek;
(b) Inkontaktbringen der rekombinanten Pflanzenzellenbibliothek mit einem nachweisbar markierten Oligonucleotid nach einem der Ansprüche 1–9 unter Hybridisierungsbedingungen, wobei Nachweis von Genen mit 50% oder mehr Sequenzidentität bereitgestellt wird; und
(c) Isolieren eines Krankheitsresistenz-Gens durch seine Assoziation mit der nachweisbaren Markierung.

27. Rekombinantes Pflanzenpolypeptid, fähig zum Übertragen von Krankheitsresistenz, wobei das Pflanzenpolypeptid eine P-Schleifen-Domäne oder eine Nucleotidbindungsstellen-Domäne umfaßt.

28. Rekombinantes Pflanzenpolypeptid nach Anspruch 27, wobei das Polypeptid weiterhin eine Leucin-reiche Wiederholungs-Domäne umfaßt.

29. Rekombinantes Pflanzenpolypeptid, fähig zum Übertragen von Krankheitsresistenz, wobei das Pflanzenpolypeptid eine Leucin-reiche Wiederholungs-Domäne enthält.

30. Pflanzenkrankheitsresistenz-Gen, isoliert gemäß dem Verfahren, umfassend:
(a) Bereitstellen einer Probe von Pflanzenzellen-DNA;
(b) Bereitstellen eines Paars von Oligonucleotiden mit Sequenzhomologie zu einer konservierten Region eines RPS-Krankheitsresistenz-Gens;
(c) Vereinigen des Paars von Oligonucleotiden mit der Pflanzenzellen-DNA-Probe unter Bedingungen, geeignet für Polymerase-Kettenreaktion-vermittelte DNA-Amplifikation; und
(d) Isolieren des amplifizierten Krankheitsresistenz-Gens oder Fragments davon.

31. Pflanzenkrankheitsresistenz-Gen, isoliert gemäß dem Verfahren, umfassend:
(a) Bereitstellen einer Zubereitung von Pflanzenzellen-DNA;
(b) Bereitstellen einer nachweisbar markierten DNA-Sequenz mit Homologie zu einer konservierten Region eines RPS-Gens;
(c) Inkontaktbringen der Zubereitung von Pflanzenzellen-DNA mit der nachweisbar markierten DNA-Sequenz unter Hybridisierungsbedingungen, wobei Nachweis von Genen mit 50% oder mehr Sequenzidentität bereitgestellt wird; und
(d) Identifizieren eines Krankheitsresistenz-Gens durch seine Assoziation mit der nachweisbaren Markierung.

32. Pflanzenkrankheitsresistenz-Gen gemäß dem Verfahren, umfassend:
(a) Bereitstellen einer rekombinanten Pflanzenzellenbibliothek;

(b) Inkontaktbringen der rekombinanten Pflanzenzellenbibliothek mit einem nachweisbar markierten Genfragment, hergestellt gemäß dem Verfahren nach den Ansprüchen 1–4, unter Hybridisierungsbedingungen, wobei Nachweis von Genen mit 50% oder mehr Sequenzidentität bereitgestellt wird; und
(c) Isolieren eines Krankheitsresistenz-Gens durch seine Assoziation mit der nachweisbaren Markierung.

33. Verfahren zum Identifizieren eines Pflanzenkrankheitsresistenz-Gens, umfassend:
(a) Bereitstellen einer Pflanzengewebeprobe;
(b) Einführen eines Kandidaten-Pflanzenkrankheitsresistenz-Gens in die Pflanzengewebeprobe durch biolistische Transformation;
(c) Exprimieren des Kandidaten-Pflanzenkrankheitsresistenz-Gens innerhalb der Pflanzengewebeprobe; und
(d) Bestimmen, ob die Pflanzengewebeprobe eine Krankheitsresistenz-Reaktion zeigt, wobei eine Reaktion ein Pflanzenkrankheitsresistenz-Gen identifiziert.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die Pflanzengewebeprobe Blatt-, Wurzel-, Blüten-, Frucht- oder Stengelgewebe umfaßt.

35. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das Kandidaten-Pflanzenkrankheitsresistenz-Gen aus einer cDNA-Expressionsbibliothek erhalten wird.

36. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die Krankheitsresistenz-Reaktion die hypersensitive Reaktion ist.

37. Pflanzenkrankheitsresistenz-Gen, isoliert gemäß dem Verfahren, umfassend:
(a) Bereitstellen einer Pflanzengewebeprobe;
(b) Einführen eines Kandidaten-Pflanzenkrankheitsresistenz-Gens in die Pflanzengewebeprobe durch biolistische Transformation;
(c) Exprimieren des Kandidaten-Pflanzenkrankheitsresistenz-Gens innerhalb der Pflanzengewebeprobe; und
(d) Bestimmen, ob die Pflanzengewebeprobe eine Krankheitsresistenz-Reaktion zeigt, wobei eine Reaktion ein Pflanzenkrankheitsresistenz-Gen identifiziert.

38. Gereinigter Antikörper, welcher spezifisch an ein Protein der RPS-Familie bindet.

39. DNA-Sequenz, im wesentlichen identisch mit der DNA-Sequenz, gezeigt in **Fig.** 12.

40. Im wesentlichen reines Polypeptid mit einer Sequenz, im wesentlichen identisch mit einer Prf-Aminosäuresequenz, gezeigt in **Fig.** 5 (A oder B).

Es folgt kein Blatt Zeichnungen