



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0308946-0 B1

(22) Data do Depósito: 21/02/2003

(45) Data de Concessão: 30/08/2016



(54) Título: ÁCIDO NUCLEICO, PROTEÍNA, VETOR RECOMBINANTE, BACTÉRIA, PROCESSOS PARA CULTIVAR PLANTA QUE APRESENTA O REFERIDO ÁCIDO NUCLEICO, PARA CULTIVAR PLANTA QUE APRESENTA A REFERIDA PROTEÍNA, PARA SELEÇÃO DE CÉLULA TRANSFORMANTE QUE APRESENTA O REFERIDO ÁCIDO NUCLEICO E PARA SELECIONAR CÉLULA TRANSFORMANTE QUE APRESENTA A REFERIDA PROTEÍNA

(51) Int.Cl.: C12N 15/29; C12N 9/88; C12N 15/60; C12N 5/14; A01H 5/00

(30) Prioridade Unionista: 29/03/2002 JP 2002-95721

(73) Titular(es): KUMIAI CHEMICAL INDUSTRY CO. LTD..

(72) Inventor(es): KOICHIRO KAKU, TSUTOMU SHIMIZU, KIYOSHI KAWAI, KOZO NAGAYAMA, ATSUNORI FUKUDA, YOSHIYUKI TANAKA

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ÁCIDO NUCLEICO, PROTEÍNA, VETOR RECOMBINANTE, BACTÉRIA, PROCESSOS PARA CULTIVAR PLANTA QUE APRESENTA O REFERIDO ÁCIDO NUCLEICO, PARA CULTIVAR PLANTA QUE APRESENTA A REFERIDA PROTEÍNA, PARA SELEÇÃO DE CÉLULA TRANSFORMANTE QUE APRESENTA O REFERIDO ÁCIDO NUCLEICO E PARA SELECIONAR CÉLULA TRANSFORMANTE QUE APRESENTA A REFERIDA PROTEÍNA".

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se a um gene que codifica a acetolactato sintase que é uma enzima que limita a velocidade na via biossintética de aminoácidos de cadeia ramificada.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

15 A acetolactato sintase (referida posteriormente aqui como "ALS") é uma enzima que limita a velocidade na via biossintética de aminoácidos de cadeia ramificada, tais como a leucina, a valina e a isoleucina e é conhecida como uma enzima essencial para o crescimento de plantas. É também sabido que a ALS está presente em uma ampla variedade de plantas superiores. Em adição, a ALS é encontrada em vários microorganismos, tais como a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*.

25 É sabido que três tipos de isoenzimas da ALS estão presentes em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Cada uma destas isoenzimas é um heterooligômero que consiste em subunidades catalíticas com um peso molecular grande que controla a atividade catalítica da enzima e de subunidades reguladoras com um peso molecular pequeno que funcionam como inibidores de retroalimentação através da ligação de aminoácidos de cadeia ramificada (Chipman, e outros, Biochim. Biophys. Acta. 1385, 401-419, 1998). As subunidades catalíticas ficam localizadas nos operons *Ilv IH*, *Ilv GM* e *Ilv BN*, respectivamente. Por outro lado, a ALS na levedura é uma única enzima que compreende uma subunidade catalítica e uma subunidade reguladora, como é o caso nas bactérias (Pang, e outros, Biochemistry, 38,

5222-5231, 1999). A subunidade protéica catalítica fica localizada no local ILV2.

Nas plantas, é sabido que a ALS consiste em subunidade(s) catalítica(s) e de subunidade(s) reguladora(s) como é o caso nos microorganismos anteriores (Hershey, e outros, Plant Molecular Biology. 40, 795-806, 1999). Por exemplo, a subunidade catalítica da ALS no tabaco (dicotiledô-

nea) é codificada por dois locais de gene, SuRA e SuRB (Lee, e outros, EMBO J. 7, 1241-1248, 1988); e que no milho é codificada por dois locais de gene, als 1 e als 2 (Burr, e outros, Trends in Genetics 7, 55-61, 1991; Lawrence, e outros, Plant Mol. Biol. 18, 1185-1187, 1992). As seqüências
5 nucleotídicas de genes que codificam uma subunidade catalítica foram completamente determinadas para as plantas dicotiledôneas incluindo o tabaco, *Arabidopsis*, a colza, o algodão, *Xanthium*, *Amaranthus* e *Kochia* (ver Chipman, e outros, Biochim. Biophys. Acta. 1385, 401-419, 1998 e a republicação doméstica da publicação internacional PCT para o pedido de patente
10 WO 97/08327). Entretanto, o milho e o arroz (Kaku, e outros, the 26th Conference of Pesticide Science Society of Japan, Lecture Abstracts, p101, 2001) são as únicas plantas monocotiledôneas cujas seqüências de nucleotídeos foram completamente determinadas.

Enquanto isso, os herbicidas, por exemplo, os herbicidas de
15 sulfoniluréia, os herbicidas de imidazolinona, os herbicidas de triazolopirimidina e os herbicidas de carbóxi pirimidinila (referidos posteriormente aqui como "herbicidas PC"), são conhecidos como supressores do crescimento de uma planta através da inibição da ALS (Ray, Plant Physiol. 75, 827-831, 1984; Shaner, e outros, Plant Physiol. 76, 545-546, 1984; Subramanian, e
20 outros, Plant Physiol. 96, 310-313, 1991; Shimizu, e outros, J. Pestic. Sci. 19, 59-67, 1994).

Como mostrado nas Tabelas 1 e 2, as plantas conhecidas por possuírem resistência a estes herbicidas, contêm um gene que codifica a ALS que inclui a substituição de um ou dois nucleotídeos que induz a substituição de um ou dois aminoácidos em uma região conservada entre espécies diferentes.
25

Tabela 1

Mutação na ALS da planta que confere resistência contra o
herbicida inibidor do tipo (I) da ALS

Espécie da Planta	Mutação	Herbicida Testado	Aminoácido da ALS correspondente do arroz
<i>Zea mays</i>	Ala90Thr	IM	Ala96Thr
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ala122Val		Ala96Val
<i>Xanthium strumarium</i>	Ala100Thr	IM	Ala96Thr
<i>Beta vulgaris</i>	Ala113Thr	IM/SU	Ala96Thr
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Met124Glu		Met98Glu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Met124Ile		Met98Ile
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Met124His		Met98His
<i>Lactuca serriola</i>	Pro→His	SU	Pro171His
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Thr	SU	Pro171Thr
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Ser	SU	Pro171Ser
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Arg	SU	Pro171Arg
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Leu	SU	Pro171Leu
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Gln	SU	Pro171Gln
<i>Kochia scoparia</i>	Pro189Ala	SU	Pro171Ala
<i>Brassica napus</i>	Pro173Ser		Pro171Ser
<i>Nicotina tabacum</i>	Pro196Gln	SU	Pro171Gln
<i>Nicotina tabacum</i>	Pro196Ala	SU	Pro171Ala
<i>Nicotina tabacum</i>	Pro196Ser	SU	Pro171Ser
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pro197Ser	SU	Pro171Ser
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pro197deleção		Pro171deleção
<i>Beta vulgaris</i>	Pro188Ser	IM/SU	Pro171Ser
<i>Sisymbrium orientale</i>	Pro→Ile		Pro171Ile
<i>Brassica tournefortii</i>	Pro→Ala		Pro171Ala
<i>Scirpus juncoides</i>	Pro→Leu	SU	Pro171Leu
<i>Scirpus juncoides</i>	Pro179Ala	SU	Pro171Ala
<i>Scirpus juncoides</i>	Pro179Gln	SU	Pro171Gln

Espécie da Planta	Mutação	Herbicida Testado	Aminoácido da ALS correspondente do arroz
<i>Scirpus juncoides</i>	Pro179Ser	SU	Pro171Ser
<i>Scirpus juncoides</i>	Pro179Lys	SU	Pro171Lys
<i>Lindernia micrantha</i>	Pro→Gln	SU	Pro171Gln
<i>Lidernia procumbens</i>	Pro→Ser	SU	Pro171Ser
<i>Lidernia dubia subsp.</i>	Pro→Ser	SU	Pro171Ser
<i>Lidernia dubia</i>	Pro→Ala	SU	Pro171Ala
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arg199Ala		Arg173Ala
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arg199Glu		Arg173Glu
<i>Xantium strumarium</i>	Ala183Val		Ala179Val
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Phe206Arg		Phe180Arg

Tabela 2

Mutação na ALS de planta que confere resistência ao
herbicida inibidor do tipo (2) da ALS

Espécie da Planta	Mutação	Herbicida Testado	Aminoácido da ALS correspondente do arroz
<i>Kochia scoparia</i>	Asp260Gly	SU	Asp242Gly
<i>Kochia scoparia</i>	Trp487Arg	SU	Try465Arg
<i>Kochia scoparia</i>	Asn561Ser	SU	Asn539Ser
<i>Kochia scoparia</i>	Trp570Leu		Trp548Leu
<i>Gossypium hirsutum L.</i>	Trp563Cys	SU ?	Try548Cys
<i>Gossypium hirsutum L.</i>	Trp563Ser	SU ?	Try548Ser
<i>Brasica napus</i>	Trp557Leu		Try548Leu
<i>Zea mays L.</i>	Trp552Leu	IM	Try548Leu
<i>Nicotina tabacum L.</i>	Trp537Leu	SU	Try548Leu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Trp574Leu		Try548Leu
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Trp574Ser		Try548Ser
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Trp574deleção		Try548deleção
<i>Xantium strumarium</i>	Trp552Leu	IM	Try548Leu

Espécie da Planta	Mutação	Herbicida Testado	Aminoácido da ALS correspondente do arroz
<i>Oryza sativa</i>	Trp548Leu	PC	Try548Leu
<i>Amaranthus sp.</i>	Trp569Leu		Try548Leu
<i>Amaransus rudis</i>	Trp569Leu	IMI	Try548Leu
<i>Sisymbrium orientale</i>	Trp→Leu		Try548Leu
<i>Zea mays</i>	Ser621Asp	IM	Ser627Asp
<i>Zea mays</i>	Ser621Asn	IM	Ser627Asn
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser653Asn	IM	Ser627Asn
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser653Thr		Ser627Thr
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser653Phe		Ser627Phe
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ser653deleção		Ser627deleção
<i>Oryza sativa</i>	Ser627Ile	PC	Ser627Ile
<i>Kochia scoparia</i>	Val276Glu	SU	

- Os exemplos de tal gene incluem um gene que codifica a ALS que possui resistência específica aos herbicidas de sulfoniluréia (ver Kathleen, e outros, EMBO J. 7, 1241-1248, 1988; Mourad, e outros, Planta, 188, 491-497, 1992; Guttieri, e outros, Weed Sci. 43, 175-178, 1995; Bernasconi, e outros, J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995; e Publicação da Patente JP (Pedido de Patente Sem Exame) Nº 63-71184); um gene que codifica a ALS que possui resistência específica aos herbicidas de imidazolinona (ver Mourad, e outros, Planta, 188, 491-497, 1992; Lee, e outros, FEBS Lett. 452, 341-345, 1999; e Publicação da Patente JP (Pedido de Patente Sem Exame) Nº 5-227964); um gene que codifica a ALS que possui resistência tanto aos herbicidas de sulfoniluréia quanto de imidazolinona (ver Kathleen, e outros, EMBO J. 7, 1241-1248, 1988; Bernasconi, e outros, J. Biol. Chem. 270, 17381-17385, 1995; Hattori, e outros, Mol. Gen. Genet. 246, 419-425, 1995; Alison, e outros, Plant Physiol. 111, 1353, 1996; Rajasekarau, e outros, Plant Sci. 119, 115-124, 1996; Relatório Descritivo da Patente JP (Pedido de Patente Sem Exame) Nº 63-71184; Publicação da Patente JP (Pedido de Patente Sem Exame) Nº 4-311392; e Bernasconi, e outros, Patente U.S. Nº

5633437, 1997); e um gene que codifica a ALS que possui um alto nível de resistência aos herbicidas de PC (Kaku, e outros, the 26th Conference of Pesticide Science Society of Japan, Lecture Abstracts, p101, 2001). Foi tentada a produção de um corpo vegetal que exibe resistência tanto aos herbicidas de sulfoniluréia quanto de imidazolinona através do cruzamento de uma planta que possui ALS que exibe resistência específica aos herbicidas de sulfoniluréia com uma planta que possui ALS que exibe resistência específica aos herbicidas de imidazolinona (Mourad, e outros, Mol. Gen. Genet, 243, 178-184, 1994). Além disso, foi tentada uma alteração artificial de um gene que codifica a ALS em um gene de resistência à herbicida (ver Ott, e outros, J. Mol. Biol. 263, 359-368, 1996, Publicação da Patente JP (Pedido de Patente Sem Exame) Nº 63-71184, Publicação da Patente JP (Pedido de Patente Sem Exame) Nº 5-227964, Publicação da Patente JP (Tradução do PCT) Nº 11-504213), de forma que foi descoberto que uma única deleção de aminoácido faz com que a ALS exiba resistência tanto aos herbicidas de sulfoniluréia quanto de imidazolinona (ver a Publicação da Patente JP (Pedido de Patente Sem Exame) Nº 5-227964).

Como descrito anteriormente, as ALSs que possuem resistência a herbicidas e os genes que codificam a ALS foram estudados a fundo. Entretanto, foram relatados somente alguns casos em relação a um gene da ALS mutante que possui resistência específica a um herbicida de PC utilizando a resistência aos herbicidas de PC como um indicador. Além disso, havia ainda somente alguns casos relatados em relação ao estudo da resistência aos herbicidas de PC e a outros herbicidas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A finalidade da presente invenção é fornecer um gene que codifica uma proteína ALS que exibe um nível extremamente alto de resistência a herbicidas de PC ou a herbicidas de sulfoniluréia, uma proteína ALS codificada pelo gene, um vetor recombinante que possui o gene, um transformante que possui o vetor recombinante, uma planta que possui o gene, um método para cultivo da planta e um método para a seleção de uma célula transformante utilizando o gene como um marcador de seleção.

Como um resultado de estudos completos para atingir a finalidade anterior, a presente invenção foi completada pela descoberta de que uma ALS mutante que é derivada da ALS do tipo selvagem através da substituição de um certo resíduo de aminoácido da ALS do tipo selvagem por um certo aminoácido exibe resistência extremamente alta aos herbicidas de PC.

(1) Especificamente, a presente invenção é um gene que codifica a proteína (a) ou (b) a seguir:

(a) uma proteína que consiste em uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 e 8;

(b) uma proteína que consiste em uma sequência de aminoácidos derivada da sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 e 8 através da substituição, da deleção ou da adição de pelo menos um ou mais aminoácidos, que possui resistência aos herbicidas de PC e possui atividade da acetolactato sintase.

(2) Ainda, a presente invenção é uma proteína acetolactato sintase, que é codificada pelo gene de (1).

(3) Além disso, a presente invenção é um vetor recombinante, que possui o gene de (1).

(4) Ainda, a presente invenção é um transformante, que possui o vetor recombinante de (3).

(5) Além disso, a presente invenção é uma planta, que possui o gene de (1) e possui resistência aos herbicidas de PC.

(6) Ainda, a presente invenção é um método para o cultivo da planta de (5) que compreende o cultivo da planta na presença de um herbicida de PC.

(7) Ainda, a presente invenção é um método para a seleção de uma célula transformante que possui o gene de (1), que utiliza este gene como um marcador de seleção.

Aqui abaixo, será fornecida uma explicação mais detalhada da presente invenção.

O gene que codifica a acetolactato sintase da presente invenção

(referida posteriormente aqui como "gene mutante da ALS") codifica uma proteína acetolactato sintase (referida posteriormente aqui como "proteína ALS mutante") que possui uma seqüência de aminoácidos que é diferente daquela de uma proteína acetolactato sintase do tipo selvagem (referida posteriormente aqui como "proteína ALS do tipo selvagem"). A proteína ALS mutante pode ser obtida através da mutação de um certo sítio em uma proteína ALS do tipo selvagem expressa em uma planta de arroz. A proteína ALS mutante da presente invenção consiste na seqüência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 e 8.

10 A seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 2 é derivada da seqüência de aminoácidos da proteína ALS do tipo selvagem através da substituição da prolina 171 pela histidina e da substituição da arginina 172 pela serina. Uma proteína ALS mutante que contém a seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 2 é referida como "proteína ALS mutante P171H/R172S" ou
15 "mutante P171H/R172S".

 A seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 4 é derivada da seqüência de aminoácidos da proteína ALS do tipo selvagem através da substituição da prolina 171 pela histidina e da substituição do triptofano 548 pela leucina. Uma proteína ALS mutante que contém a seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 4 é referida como "proteína ALS mutante P171H/W548L" ou
20 "mutante P171H/W548L".

 A seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 6 é derivada da seqüência de aminoácidos da proteína ALS do tipo selvagem através da substituição da prolina 171 pela histidina e da substituição da serina 627 pela isoleucina. Uma proteína ALS mutante que contém a seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 6 é referida como "proteína ALS mutante P171H/S627I" ou
25 "mutante P171H/S627I".

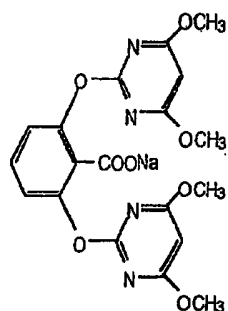
 A seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 8 é derivada da seqüência de aminoácidos da proteína ALS do tipo selvagem através da substituição da prolina 171 pela histidina, da substituição do triptofano 548 pela leucina e da substituição da serina 627 pela isoleucina. Uma proteína ALS mutante que contém a seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 8 é
30

referida como "proteína ALS mutante P171H/W548L/S627I" ou "mutante P171H/W548L/S627I".

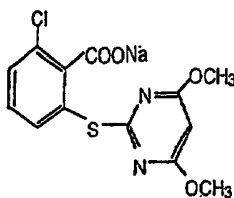
As Figuras 1A e B exibem os resultados das comparações entre as seqüências de aminoácidos destes 4 tipos de proteínas ALS mutantes e a seqüência de aminoácidos da proteína ALS do tipo selvagem. Ainda, nas Figuras 1A e B, a seqüência de aminoácidos na 1ª fileira representa a proteína ALS do tipo selvagem, a seqüência de aminoácidos na 2ª fileira representa a proteína ALS mutante P171H/R172S, a seqüência de aminoácidos na 3ª fileira representa a proteína ALS mutante P171H/W548L, a seqüência de aminoácidos na 4ª fileira representa a proteína ALS mutante P171H/S627I e a seqüência de aminoácidos na 5ª fileira representa a proteína ALS mutante P171H/W548L/S627I.

Comparadas com a proteína ALS do tipo selvagem, estas proteínas ALS mutantes possuem boa resistência não somente aos herbicidas de PC, mas também aos herbicidas de sulfoniluréia e de imidazolinona. Esta pode ser determinada através da subclonagem de um gene que codifica a proteína ALS mutante no pGEX 2T, da transformação em *E. coli* ou similar com o pGEX 2T e então da verificação da sensibilidade da proteína ALS mutante expressa aos herbicidas.

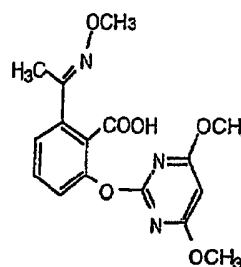
Os exemplos de um herbicida de PC incluem o bispiribac-sódio, o piritiobac-sódio e o piriminobac, que são representados pela fórmula química 1 a seguir.



bispiribac-sódio

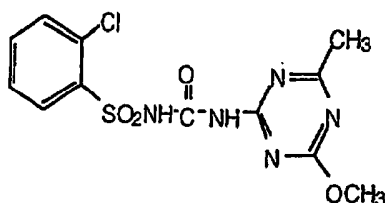


piritiobac-sódio



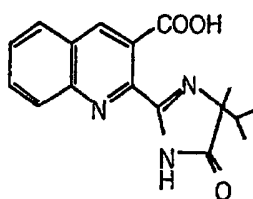
piriminobac

Um exemplo de um herbicida de sulfoniluréia é a clorossulfuro-na, que é representada pela fórmula química 2 a seguir.



clorossulfurona

Um exemplo de um herbicida de imidazolinona é a imazaquina, que é representada pela fórmula química 3 a seguir.



imazaquina

- 5 Em particular, a proteína ALS mutante P171H/R172S exibe resistência a um herbicida a um nível não somente melhor que o de uma proteína ALS mutante que possua independentemente P171H ou R172S, mas também superior à resistência combinada prevista partindo das proteínas ALS mutantes que possuem independentemente P171H ou R172S. Ainda, a
- 10 proteína ALS mutante que possui independentemente R172S não exibe resistência a quaisquer herbicidas, portanto, a mutação R172S é uma mutação silenciosa. Em outras palavras, na proteína ALS mutante P171H/R172S, a mutação R172S, que é uma mutação por si só silenciosa, aumenta a resistência da proteína ALS mutante P171H.
- 15 Ainda, a proteína mutante P171H/W548L exibe resistência a um certo herbicida a um nível não somente melhor que o de uma proteína ALS mutante que possua independentemente P171H ou W548L, mas ainda melhor que a resistência combinada prevista partindo das proteínas ALS mutantes que possuem independentemente P171H ou W548L. Em outras pala-
- 20 vras, a proteína mutante P171H/W548L exibe resistência que é muito maior que a do efeito sinérgico previsto das resistências tanto da proteína mutante P171H quanto da proteína mutante W548L.

Ainda, em particular, a proteína mutante P171H/S627I exibe re-

sistência a um certo herbicida a um nível não somente melhor que o de uma proteína ALS mutante que possua independentemente P171H ou S627I, mas ainda melhor que a resistência combinada prevista partindo das proteínas ALS mutantes que possuem independentemente P171H ou S627I. Em outras palavras, a proteína mutante P171H/S627I exibe resistência que é muito maior que o efeito sinérgico previsto das resistências tanto da proteína mutante P171H quanto da proteína mutante S627I.

Ainda, em particular, a proteína mutante P171H/W548L/S627I exibe resistência a um certo herbicida melhor que a de uma proteína ALS mutante que possui independentemente P171H, W548L ou S627I.

Além disso, a proteína ALS mutante da presente invenção pode consistir em qualquer seqüência de aminoácidos derivada da seqüência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 e 8 através da substituição, da deleção ou da adição de pelo menos um ou mais aminoácidos, contanto que a seqüência possua resistência a um herbicida de PC e possua atividade da acetolactato sintase. Aqui, "um ou mais aminoácidos" refere-se preferencialmente a 1 até 30 aminoácidos, mais preferencialmente 1 até 20 aminoácidos e mais preferencialmente 1 até 10 aminoácidos.

Particularmente, na seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 2, "pelo menos um ou mais aminoácidos" são preferencialmente aminoácidos sem ser o 171^o e o 172^o aminoácidos. Na seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 4, "pelo menos um ou mais aminoácidos" são preferencialmente aminoácidos sem ser o 171^o e o 548^o aminoácidos. Na seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 6, "pelo menos um ou mais aminoácidos" são preferencialmente aminoácidos sem ser o 171^o e o 627^o aminoácidos. Na seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 8, "pelo menos um ou mais aminoácidos" são preferencialmente aminoácidos sem ser o 171^o, o 627^o e o 548^o aminoácidos.

O gene ALS mutante da presente invenção não é especificamente limitado, contanto que possua uma seqüência que codifica a proteína ALS mutante descrita anteriormente. Os exemplos da seqüência de nucleotídeos incluem a seqüência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID

N^{os}: 1, 3, 5 e 7. A seqüência de nucleotídeos da SEQ ID N^o: 1 codifica a seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 2, a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID N^o: 3 codifica a seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 4, a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID N^o: 5 codifica a seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 6 e a seqüência de nucleotídeos da SEQ ID N^o: 7 codifica a seqüência de aminoácidos da SEQ ID N^o: 8. O gene ALS mutante pode possuir uma seqüência de nucleotídeos derivada da seqüência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 1, 3, 5 e 7 através da substituição de um códon para um certo aminoácido com um códon degenerado.

10 As Figuras 2A, B, C e D exibem os resultados de comparações entre as seqüências de nucleotídeos para estes 4 tipos de proteínas ALS mutantes e a seqüência de nucleotídeos que codifica uma proteína ALS do tipo selvagem. Nas Figuras 2A, B, C e D, a seqüência de nucleotídeos na 1^a fileira representa a proteína ALS do tipo selvagem, a seqüência de nucleotídeos na 2^a fileira representa a proteína ALS mutante P171H/R172S, a seqüência de nucleotídeos na 3^a fileira representa a proteína ALS mutante P171H/W548L, a seqüência de nucleotídeos na 4^a fileira representa a proteína ALS mutante P171H/S627I e a seqüência de nucleotídeos na 5^a fileira representa a proteína ALS mutante P171H/W548L/S627I.

20 Além disso, o gene ALS mutante da presente invenção pode consistir em uma seqüência de nucleotídeos que pode se hibridizar sob condições rigorosas com uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 1, 3, 5 e 7 e codifica uma seqüência de aminoácidos que possui atividade da acetolactato sintase. "Condições rigorosas" refere-se às condições em que um híbrido assim chamado de específico é formado e um híbrido não-específico não é formado. Os exemplos de tais condições rigorosas incluem condições através das quais os DNAs que possuem alta homologia um com os outros (por exemplo, DNAs que possuem 50% ou mais de homologia um com os outros) se hibridizam e os DNAs que possuem baixa homologia um com os outros não se hibridizam. Os exemplos específicos das condições rigorosas sob as
30 quais a hibridização é possível, incluem condições para a lavagem na hibri-

dização normal de Southern de 60°C e uma concentração de sais que corresponde a SSC 1x, SDS 0,1% ou preferencialmente SSC 0,1x, SDS 0,1%.

Os genes que codificam estas proteínas ALS mutantes podem ser obtidos através da introdução de uma mutação que é descrita anteriormente em um gene que codifica uma proteína ALS do tipo selvagem que
5 está presente no DNA genômico da variedade de arroz do tipo japônica, Kinmaze. Para introduzir mutações, podem ser empregadas quaisquer técnicas conhecidas. Por exemplo, pode ser utilizada a mutagênese direcionada ao sítio. A mutagênese direcionada ao sítio pode ser realizada utilizando um
10 kit comercial, por exemplo, Mutan-K (Takara Shuzo), Gene Editor (Promega) ou ExSite (Stratagene).

Em adição, um gene que codifica a proteína ALS mutante pode ser obtido através do cultivo de células de cultura do tipo selvagem sensíveis a um herbicida de PC na presença do herbicida de PC e então da obtenção
15 do gene das células de cultura mutantes que surgem e exibem resistência ao herbicida de PC. Então, um gene que codifica a proteína ALS que possui uma nova combinação de mutações pode ser sintetizado com base nas mutações encontradas dessa maneira através do método da PCR e do método da SPR (reação da própria polimerase) utilizando enzimas.

20 Especificamente, primeiro, os mRNAs são preparados partindo de células de cultura mutantes resistentes a um herbicida de PC, os cDNAs são sintetizados e então uma biblioteca de cDNA de fago λ gt 11 é construída. Então, a biblioteca é selecionada utilizando uma sonda de ácido nucléico que contém parte de um gene que codifica a proteína ALS do tipo selvagem.
25 Depois, o inserto de DNA do clone positivo resultante é subclonado no pBluescript II SK+, para determinar a sequência de nucleotídeos. Para os insertos de cDNA que mostraram possuir mutações, os fragmentos que contêm a mutação são sintetizados através dos métodos da PCR e da SPR utilizando como um molde o pBluescript II SK+ que mantém o inserto de
30 DNA e iniciadores planejados com base no gene ALS do arroz do tipo selvagem. Enquanto isso, os DNAs genômicos são preparados partindo de células de cultura de arroz resistentes aos herbicidas de PC e vários iniciadores

são planejados com base nos genes ALS do arroz. Então, uma passagem de iniciador (primer walking) é realizada, de forma que as seqüências dos genes ALS presentes nos DNAs genômicos preparados são determinadas e são encontrados os sítios de mutação. Quando são encontradas mutações,

5 os fragmentos que contêm as mutações são sintetizados através dos métodos da PCR e da SPR. Os fragmentos que contêm as mutações sintetizadas do cDNA do ALS mutante clonado no pBluescript II SK+ (incluindo os fragmentos que contêm estas mutações) são subclonados no pGEX 2T e então a *E. coli* é transformada utilizando o vetor.

10 Os clones que possuem os insertos dos DNAs que codificam as seqüências de aminoácidos representadas pelas SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 ou 8 são então selecionados, de forma que os genes que codificam as proteínas ALS mutantes possam ser obtidos. Em adição, o plasmídeo obtido dessa forma em que um gene que codifica uma proteína ALS mutante contendo a

15 seqüência de aminoácidos representada pela SEQ ID N^o: 2 foi incorporado no pGEX 2T e foi depositado como o cDNA 1 do ALS Mutante do Arroz (FERM BP-7944), o plasmídeo em que um gene que codifica uma proteína ALS mutante contendo a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ ID N^o: 4 foi incorporado no pGEX 2T foi depositado como o cDNA 2 do ALS

20 Mutante do Arroz (FERM BP-7945), o plasmídeo em que um gene que codifica uma proteína ALS mutante contendo a seqüência de aminoácidos representada pela SEQ ID N^o: 6 foi incorporado no pGEX 2T foi depositado como o cDNA 3 do ALS Mutante do Arroz (FERM BP-7946) e o plasmídeo em que um gene que codifica uma proteína ALS mutante contendo a seqüência de

25 aminoácidos representada pela SEQ ID N^o: 8 foi incorporado no pGEX 2T foi depositado como o cDNA 4 do ALS Mutante do Arroz (FERM BP-7947) junto ao Patent and Bio-Resource Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Chuo-6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japão) em 8 de março de 2002 sob o Tratado de Budapeste.

30 Por outro lado, a transformação de uma planta alvo utilizando um gene que codifica a proteína ALS mutante pode conferir resistência a vários herbicidas, tais como os herbicidas de PC, à planta. Qualquer técnica

pode ser utilizada para a transformação de uma planta. Por exemplo, um gene estranho pode ser introduzido em uma planta alvo utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

Mais especificamente, um gene que codifica a proteína ALS
5 mutante é inserido em um vetor binário que contém a seqüência de T-DNA de um plasmídeo Ti de *Agrobacterium*. O plasmídeo Ti é transformado em *E. coli* e similares. Então, os vetores binários que retêm o gene que codifica a proteína ALS mutante replicada, por exemplo, por *E. coli* são transformados em Agrobactérias que contêm plasmídeos auxiliares. As plantas alvo são
10 infectadas com Agrobactérias e então as plantas transformadas são identificadas. Quando a planta transformada identificada for uma cultura de células, a célula vegetal pode ser regenerada em uma planta completa através de qualquer técnica conhecida.

Para transformar uma planta alvo com um gene que codifica a
15 proteína ALS mutante, o gene pode ser introduzido diretamente utilizando técnicas padrão conhecidas. Os exemplos de um método que transforma um vetor de expressão contendo um gene que codifica a proteína ALS mutante incluem o método do polietileno glicol, a eletroporação e o método de pistola de partículas.

20 Um gene que codifica a proteína ALS mutante pode ser transformado em qualquer tipo de planta, tais como plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas. Os exemplos de uma planta de cultivo alvo na qual um gene que codifica a proteína ALS mutante é transformado, incluem o arroz, o milho, o trigo, a cevada, a soja, o algodão, a colza, a beterraba e o tabaco. Em
25 adição, a turfa, árvores e similares podem ser transformados através da introdução de um gene que codifica a proteína ALS mutante.

Em qualquer um dos casos anteriores, a transformação de uma planta que utiliza um gene que codifica a proteína ALS mutante pode conferir resistência aos herbicidas de PC, aos herbicidas de sulfoniluréia e aos her-
30 bicidas de imidazolinona à planta.

Além disso, um gene que codifica a proteína ALS mutante pode também ser utilizado como um marcador de seleção em um experimento

para a transformação de uma planta. Por exemplo, para transformar uma célula vegetal utilizando um gene alvo, um vetor que possui um gene que codifica a proteína ALS mutante e um gene alvo é introduzido na célula vegetal, seguido pelo cultivo da célula vegetal na presença de um herbicida de PC ou similar. Se a célula vegetal sobreviver à presença do herbicida, isto indica que a célula vegetal contém um gene que codifica a proteína ALS mutante e o gene de interesse introduzido ali. Ainda, o fato de um gene alvo e um gene que codifica a proteína ALS mutante serem incorporados no cromossomo de uma célula vegetal pode ser confirmado através da observação do fenótipo da planta e então da verificação da presença destes genes no genoma, através da hibridização por Southern do genoma ou da PCR.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1A exibe uma comparação da sequência de aminoácidos entre as proteínas ALS mutantes e a proteína ALS do tipo selvagem.

A Figura 1B é uma continuação da Figura 1A e exibe uma comparação da sequência de aminoácidos entre as proteínas ALS mutantes e a proteína ALS do tipo selvagem.

A Figura 2A exibe uma comparação da sequência de nucleotídeos entre os genes ALS mutantes e o gene ALS do tipo selvagem.

A Figura 2B é uma continuação da Figura 2A e exibe uma comparação da sequência de nucleotídeos entre os genes ALS mutantes e o gene ALS do tipo selvagem.

A Figura 2C é uma continuação da Figura 2B e exibe uma comparação da sequência de nucleotídeos entre os genes ALS mutantes e o gene ALS do tipo selvagem.

A Figura 2D é uma continuação da Figura 2C e exibe uma comparação da sequência de nucleotídeos entre os genes ALS mutantes e o gene ALS do tipo selvagem.

A Figura 3 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem Rb ao bispiribac-sódio.

A Figura 4 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem Sr ao bispiribac-sódio.

A Figura 5 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem Ga ao bispiribac-sódio.

A Figura 6 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem Vg ao bispiribac-sódio.

5 A Figura 7 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem do tipo selvagem ao bispiribac-sódio.

A Figura 8 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem do tipo selvagem à clorossulfurona.

10 A Figura 9 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem Rb à clorossulfurona.

A Figura 10 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem Sr à clorossulfurona.

A Figura 11 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem Ga à clorossulfurona.

15 A Figura 12 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da linhagem Vg à clorossulfurona.

A Figura 13 é uma figura característica que mostra a relação entre o número de fração e a absorbância a uma OD de 525 nm em uma cromatografia em coluna de troca iônica realizada com a finalidade de separar a
20 proteína ALS do mutante resistente.

A Figura 14 é uma figura característica que mostra a relação entre o número de fração e a absorbância a uma OD de 525 nm em uma cromatografia em coluna de troca iônica realizada com a finalidade de separar a proteína ALS do tipo selvagem.

25 A Figura 15 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da proteína ALS do tipo selvagem e da proteína ALS mutante ao bispiribac-sódio.

A Figura 16 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da proteína ALS do tipo selvagem e da proteína ALS mutante à clorossulfurona.
30

A Figura 17 é uma figura característica que mostra a sensibilidade da proteína ALS do tipo selvagem e da proteína ALS mutante à

imazaquina.

A Figura 18A exibe uma comparação de sequência de nucleotídeos entre o gene EST possuído pelo Japão e o ALS do milho.

5 A Figura 18B é uma continuação da Figura 18A e mostra uma comparação de sequência de nucleotídeos entre o gene EST possuído pelo Japão e o ALS do milho.

A Figura 19A é uma comparação de sequências de nucleotídeos entre o cDNA de comprimento completo derivado da linhagem Sr e o cDNA 1 do tipo selvagem.

10 A Figura 19B é uma continuação da Figura 19A e mostra uma comparação de sequências de nucleotídeos entre o cDNA de comprimento completo derivado da linhagem Sr e o cDNA 1 do tipo selvagem.

A Figura 19C é uma continuação da Figura 19B e mostra uma comparação de sequências de nucleotídeos entre o cDNA de comprimento
15 completo derivado da linhagem Sr e o cDNA 1 do tipo selvagem.

A Figura 20 mostra os processos para a síntese de cDNAs da ALS que possuem independentemente a mutação G1643T (W548L) ou a mutação G1880T (S627I) e para a construção do pGEX 2T que retém o cDNA da ALS. As setas significam os iniciadores e os asteriscos significam
20 os pontos que sofreram mutação.

A Figura 21 mostra um processo para a preparação do fragmento de DNA mutante C512A (P171H) e do fragmento de DNA mutante C514A (R172S). As setas significam os iniciadores e os asteriscos significam os pontos que sofreram mutação.

25 A Figura 22 mostra processos para a síntese de cDNAs da ALS que possuem independentemente a mutação C512A (P171H) ou a mutação C514A (R172S) e para a construção do pGEX 2T que mantém o cDNA da ALS. Os asteriscos significam os pontos que sofreram mutação.

30 A Figura 23 mostra um processo para a preparação de um fragmento de DNA que possui C512A (P171H)/C514A (R172S). As setas significam os iniciadores e os asteriscos significam os pontos que sofreram mutação.

A Figura 24 mostra processos para a síntese do cDNA da ALS mutante P171H/W548L e do cDNA da ALS mutante P171H/S627I e para a construção do pGEX 2T que mantém o cDNA da ALS. Os asteriscos significam os pontos que sofreram mutação.

5 A Figura 25 mostra processos para a síntese do cDNA da ALS mutante P171H/W548L/S627I e para a construção do pGEX 2T que mantém o cDNA da ALS. Os asteriscos significam os pontos que sofreram mutação.

A Figura 26 mostra uma comparação da sensibilidade ao bispiribac-sódio entre a proteína ALS mutante codificada pelo gene ALS mutante no ponto 1 e a proteína ALS do tipo selvagem.

A Figura 27 mostra uma comparação da sensibilidade ao bispiribac-sódio entre as proteínas ALS mutantes codificadas pelos genes da ALS mutante no ponto 2 e no ponto 3 e a do tipo selvagem.

MELHOR FORMA DE REALIZAR A INVENÇÃO

15 Agora, a presente invenção será adicionalmente descrita pelos exemplos a seguir, mas o âmbito técnico da invenção não está limitado por estes exemplos.

[Exemplo 1] Produção de células de cultura de arroz (Kinmaze) resistentes a um herbicida de PC

20 A alimpadura foi removida das sementes de arroz (variedade: Kinmaze, nome científico: *Oryza sativa* variante Kinmaze). As sementes foram imersas em etanol a 70% durante 5 minutos e então imersas em antiformina a aproximadamente 5% durante 20 minutos, seguida pela lavagem várias vezes com água destilada esterilizada. Então, as sementes foram submetidas à cultura estática em um meio com uma composição que é mostrada na Tabela 3.

Tabela 3

Sal inorgânico (solução salina misturada para o meio Murashige-Skoog)	1 embalagem
Tiamina-HCl (0,1 g/l)	1 ml
Ácido Nicotínico (0,5 g/l)	1 ml
Piridoxina-HCl (0,5 g/l)	1 ml
Glicina (2 g/l)	1 ml
mio-inositol (50 g/l)	2 ml
2,4-D (200 ppm)	10 ml
Sacarose	30 g
Gelrite	3 g
Preparar o meio até 1000 ml com água destilada e ajustar o pH em 5,7.	

Na composição de meio anterior, o 2,4-D é auxina sintetizada. Para preparar o meio, primeiro, um meio com as composições anteriores foi colocado em um béquer de 1 L e foi adicionada a água destilada no béquer até 1000 mL. Depois, a solução foi ajustada em pH 5,7 e suplementada com 3 g de Gelrite. O Gelrite foi bem-dissolvido através de aquecimento com um forno de microondas e então 30 mL da mistura foram adicionados aos frascos de cultura utilizando uma pipeta. Depois, três folhas de papel de alumínio foram colocadas sobre o frasco de cultura, seguidas pelo aquecimento para a esterilização em uma autoclave a 121°C durante 15 até 20 minutos. Finalmente, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente de forma que os meios para a cultura estática das sementes anteriores foram preparados.

Depois, as partes de endosperma foram removidas do calo induzido no meio e então foi realizada uma subcultura. Então, parte dos calos obtidos foi subcultivada, ou seja, cultivada sucessivamente uma vez a cada duas semanas em um meio líquido (a composição é a mesma que a mostrada na Tabela 3, mas não suplementado com Gelrite) suplementado com bispiribac-sódio 1 μ M (um tipo de herbicida de PC). Duas até 6 semanas mais tarde, as células da cultura começaram a murchar. Aproximadamente 2 me-

ses depois, foi obtida uma grande quantidade de massas celulares não descoradas que se acreditava ser condutora da divisão celular proveniente de populações de culturas de células das quais a maioria morreu e se tornou marrom descorado. Estas massas de células foram isoladas e cultivadas, de
5 forma que foi obtida uma grande quantidade de linhagens de células que podem se proliferar na presença de bispiribac-sódio a 2 μM . As linhagens de células obtidas foram nomeadas de linhagem Rb, linhagem Sr, linhagem Ga e linhagem Vg, respectivamente.

Subseqüentemente, a grande quantidade resultante de linha-
10 gens de células foi cultivada enquanto a concentração de bispiribac-sódio era elevada de uma forma ordenada. Como um resultado, foram obtidas linhagens de células que podem ser proliferar na presença de bispiribac-sódio a 100 μM . As células de cultura resistentes ao bispiribac-sódio (referidas posteriormente aqui como "mutante resistente") foram subcultivadas em
15 meios sólidos MS-2,4-D suplementados com 1 até 10 μM de bispiribac-sódio. Foram retiradas amostras de parte do mutante resistente subcultivado, adicionadas aos meios líquidos MS-2,4-D não-suplementados com bispiribac-sódio e então submetidas à cultura de células em suspensão em um ciclo de 8 até 10 dias.

20 Aproximadamente 1,5 g (peso úmido) do mutante resistente foi transplantado em um frasco Erlenmeyer de 200 mL suplementado com 50 mL de um meio líquido MS-2,4-D e bispiribac-sódio a uma certa concentração, seguido pelo cultivo a aproximadamente 27°C durante um certo período. O peso úmido do calo foi medido periodicamente. A quantidade relativa
25 do aumento foi determinada com base no peso seco do mutante resistente transplantado. Em adição, o experimento foi realizado três vezes com concentrações diferentes de bispiribac-sódio e o erro padrão foi calculado. As Figuras 3 até 6 mostram a relação entre as alterações na concentração de bispiribac-sódio e o peso relativo no 8º ou no 12º dias no mutante resistente.
30 Como um controle, foi realizado um experimento similar utilizando o tipo selvagem (Kinmaze). A Figura 7 mostra o resultado da medida da relação entre a concentração de bispiribac-sódio e o peso relativo no 8º dia no tipo selva-

gem (Kinmaze).

Como mostrado na Figura 7, o crescimento do tipo selvagem não foi inibido em um grupo suplementado com 1 nM de bispiribac-sódio, mas foi inibido em um grupo suplementado com 10 nM ou mais de bispiribac-sódio. Por outro lado, como mostrado nas Figuras 3 até 6, quase nada do crescimento dos mutantes resistentes (linhagem Rb, linhagem Sr, linhagem Ga e linhagem Vg) sem ser a linhagem Vg foi afetado mesmo em um grupo suplementado com 10 μ M de bispiribac-sódio. Mesmo na linhagem Vg, foi mostrado que o efeito do bispiribac-sódio sobre o crescimento era menor que sobre o tipo selvagem.

Ainda no caso da utilização da clorossulfurona ao invés do bispiribac-sódio, as taxas de crescimento do tipo selvagem e dos mutantes resistentes foram medidas como descrito anteriormente. A Figura 8 mostra a relação entre as alterações na concentração de clorossulfurona e no peso relativo no 9º dia no tipo selvagem. Ainda, as Figuras 9 até 12 mostram a relação entre as alterações na concentração da clorossulfurona e no peso relativo no 8º ou no 10º dia nos mutantes resistentes, isto é, na linhagem Rb, na linhagem Ga e na linhagem Vg.

Como mostrado na Figura 8, o crescimento do tipo selvagem foi inibido através da adição de 1 nM de clorossulfurona, mostrando que o tipo selvagem possui maior sensibilidade à clorossulfurona que ao bispiribac-sódio. Entretanto, como mostrado nas Figuras 9 até 12, a linhagem Rb, a linhagem Sr, a linhagem Ga e a linhagem Vg diferiram em relação à sensibilidade, mas o crescimento não foi inibido tanto através da adição da clorossulfurona, mostrando sua resistência à clorossulfurona. A sensibilidade ao bispiribac-sódio e à clorossulfurona permaneceu quase inalterada tanto no tipo selvagem quanto nos mutantes resistentes, mesmo com uma maior duração de cultura. A taxa de crescimento era quase a mesma no tipo selvagem e nos mutantes resistentes.

Estes resultados revelaram que os mutantes resistentes possuem alta resistência ao bispiribac-sódio. Além disso, foi mostrado que os mutantes resistentes possuem maior resistência à clorossulfurona comparados

ao tipo selvagem.

[Exemplo 2] Sensibilidade ao herbicida da proteína ALS parcialmente purificada do mutante resistente

Neste exemplo, a proteína ALS mutante foi parcialmente purificada dos mutantes resistentes obtidos no Exemplo 1 (linhagem Rb, linhagem Sr e linhagem Vg, com a linhagem Ga excluída) e então a sensibilidade ao herbicida da proteína ALS mutante obtida foi verificada. A proteína ALS mutante foi parcialmente purificada como a seguir.

Primeiro, 200 g ou mais de mutante resistente foram preparados através de um método de cultura líquida (sem suplementação com bispiribac-sódio), utilizando uma composição que é mostrada na Tabela 3 excluindo o Gelrite. Então, aproximadamente 150 g do mutante resistente foram homogeneizados utilizando Hiscotron em um volume de tampão 1 [tampão de fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,5) contendo 20% (v/v) de glicerol, pirofosfato de tiamina 0,5 mM (TPP), dinucleotídeo de adenina flavina 10 μ M (FAD), $MgCl_2$ 0,5 mM e um volume de polivinil polipirrolidona a um décimo do volume do tecido] 3 vezes maior que o volume do tecido. O homogenato foi filtrado através de uma gaze de náilon e então centrifugado a 15000 x g durante 20 minutos. O sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante centrifugado a uma saturação de 50% e então foi permitido que ficasse em repouso no gelo durante aproximadamente 1 hora. A mistura foi novamente centrifugada a 15000 x g durante 20 minutos e então a fração precipitada foi dissolvida em aproximadamente 30 mL de tampão 2 [tampão de Tris ácido clorídrico 10 mM (pH 7,5) contendo 20% (v/v) de glicerol, 0,5 mM de TPP e 0,5 mM de $MgCl_2$]. A mistura foi novamente centrifugada a 15000 x g durante 20 minutos e então a fração do sobrenadante foi aplicada a um Sephadex G-25 (Amersham Bioscience). Aproximadamente 40 mL da fração que foi passada através da coluna foram coletados na forma de uma solução enzimática bruta.

Depois, a concentração de proteínas da solução enzimática bruta foi medida através do método de Bradford de acordo com o manual de Ensaio de Proteínas da Bio-Rad. A solução enzimática bruta foi então filtrada

através de um filtro Whatman (Whatman) e então a solução enzimática bruta em uma quantidade de proteína apropriada (10 até 15 mL) foi aplicada em três colunas HiTrap Q conectadas verticalmente (Amersham Bioscience) utilizando um dispositivo de FPLC (Amersham Bioscience). Após o componente protéico ter sido adsorvido utilizando HiTrap Q, as frações não-adsorvidas foram lavadas utilizando o tampão 2 que possui um volume 3 até 5 vezes maior que o volume do leito. Então, o componente protéico adsorvido foi eluído utilizando um eluato que possui um volume 10 vezes maior que o volume do leito (150 mL). Aqui, o eluato foi preparado através da dissolução de KCl com um gradiente de concentração linear (0 até 0,4 M) em tampão 2. O eluato contendo o componente protéico eluído foi dividido proporcionalmente, 5 mL cada, em um grande número de tubos de ensaios para separações proporcionais. Ainda, para estabilizar a proteína ALS contida no componente protéico eluído, 0,5 mL de tampão 2 contendo piruvato de sódio a 20 mM foi adicionado anteriormente a cada tubo de ensaio para a divisão proporcional.

A atividade da ALS resultante da proteína ALS mutante contida nas frações eluídas divididas proporcionalmente em cada tubo de ensaio para divisão proporcional foi medida como a seguir. Uma solução de reação a ser utilizada em uma reação de medida foi preparada através da mistura de uma fração eluída a ser medida com uma solução que compreende 20 mM de piruvato de sódio, 0,5 mM de TPP, 0,5 mM de $MgCl_2$, 10 μM de FAD e 20 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,5). Um mL desta solução de reação foi utilizado. Após a fração eluída a ser medida ter sido adicionada, a reação de medida foi realizada a 30°C durante 40 até 60 minutos. Então, a reação foi interrompida através da adição de 0,1 mL de ácido sulfúrico a 6 N (ou hidróxido de sódio a 0,25 N).

Após a reação ter sido interrompida, a solução de reação foi incubada a 60°C durante 10 minutos, convertendo assim o acetolactato contido na solução de reação em acetoína.

Então, para quantificar a acetoína contida na solução de reação, 1 mL de 0,5% (p/v) de creatina e 1 mL de 5% (p/v) de α -naftol dissolvido em

hidróxido de sódio a 2,5 N foram adicionados na solução de reação, seguidos pela incubação a 37°C durante 10 minutos. A acetoina foi então quantificada através da comparação de cor da absorbância (a 525 nm) da solução de reação, avaliando assim a atividade da ALS. Em adição, uma vez que a
5 solução de reação continha uma pequena quantidade de piruvato de sódio, o tempo 0 de reação foi utilizado como controle.

Como um resultado, a absorbância a uma OD a 525 nm era tão alta quanto aproximadamente 7 por 0,2 mL da solução de reação. Entretanto, quando a reação de medida anterior foi interrompida com hidróxido de
10 sódio e a atividade de produção de acetoina causada pela atividade sem ser a atividade da ALS foi examinada, aproximadamente 80% da atividade de ALS aparente resultaram da atividade de produção direta da acetoina que não era causada pela atividade da proteína ALS mutante. Conseqüentemente, a proteína ALS mutante e as outras proteínas foram separadas em
15 relação à atividade de produção de acetoina através de FPLC utilizando uma resina de troca aniônica. A Figura 13 mostra o resultado no caso da utilização da linhagem Sr como um mutante resistente. Como um resultado, três picos de atividade foram detectados como é mostrado na Figura 13.

Para determinar qual dos três picos de atividade correspondia à
20 da proteína ALS mutante, a atividade de produção de acetoina foi examinada para cada pico. Assim foi descoberto que uma fração mostrada pelo pico de eluição inicial correspondia à proteína ALS mutante.

Utilizando a solução de enzima contendo a proteína ALS mutante, a sensibilidade da proteína ALS mutante ao bispiribac-sódio, à clorossulfurona e à imazaquina foi examinada. A sensibilidade a cada um destes
25 herbicidas foi avaliada através da medição da atividade da ALS da mesma maneira que na reação de medição acima, exceto pelo fato de que foi adicionado um herbicida a uma certa concentração antes da adição da solução de enzima. Para comparação, a proteína ALS do tipo selvagem foi separada
30 e purificada (Fig. 14) da mesma maneira e utilizada para o experimento. Em adição, o bispiribac-sódio foi preparado na forma de uma solução aquosa e a clorossulfurona e a imazaquina foram preparadas na forma de soluções de

acetona. A concentração final de acetona na mistura de reação era de 1%.

A Figura 15 mostra a relação entre a taxa de inibição da atividade da ALS e a concentração de bispiribac-sódio. A Figura 16 mostra a relação entre a taxa de inibição da atividade da ALS e a concentração de clorossulfurona. A Figura 17 mostra a relação entre a taxa de inibição da atividade da ALS e a concentração de imazaquina. Nestas Figuras 15 até 17, uma linha pontilhada significa a proteína ALS do tipo selvagem, uma linha de pontilhado duplo com traços longos significa a linhagem Sr da proteína ALS mutante, uma linha completa significa a linhagem Rb da proteína ALS mutante e uma linha pontilhada com traços longos significa a linhagem Vg da proteína ALS mutante.

Uma concentração de herbicida que inibe 50% da atividade da ALS (I₅₀) foi encontrada partindo do cálculo de acordo com a análise probit, calculando assim a razão da I₅₀ para a proteína ALS mutante vs. a I₅₀ para a proteína ALS do tipo selvagem.

A Tabela 4 mostra os resultados.

Tabela 4

Herbicida	I ₅₀ (nM)			
	Tipo Selvagem	Vg	Sr	Rb
Bispiribac-sódio	5,63	97,2	421	247000
Clorossulfurona	17,3	495	92,8	32000
Imazaquina	1480	44100	16700	609000

Ainda, com base nos resultados na Tabela 4, a I₅₀ do mutante resistente contra cada herbicida foi dividida pela I₅₀ do tipo selvagem para calcular RS. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5

Herbicida	Proporção de RS		
	Vg	Sr	Rb
Bispiribac-sódio	17,3	74,8	43900
Clorossulfurona	28,6	5,36	1850
Imazaquina	29,8	11,3	411

Como mostrado nas Figuras 15 até 17 e nas Tabelas 4 e 5, a proteína ALS mutante exibiu uma atividade de ALS relativamente alta mesmo na presença do herbicida, quando comparada com a da proteína ALS do tipo selvagem. Em particular, foi mostrado que as proteínas ALS mutantes derivadas da linhagem Rb e da linhagem Sr possuem sensibilidade ao bispiribac-sódio que era significativamente superior às sensibilidades aos outros herbicidas. Ou seja, as linhagens Rb e Sr possuem boa resistência ao bispiribac-sódio em particular.

[Exemplo 3] Clonagem de genes ALS do tipo selvagem e mutante

Neste exemplo, um gene (com o gene ALS do tipo selvagem) que codifica a proteína ALS do tipo selvagem foi clonado partindo do tipo selvagem, enquanto que um gene (gene ALS mutante) que codifica a proteína ALS mutante foi clonado partindo do mutante resistente.

As sondas utilizadas para a clonagem do gene ALS do tipo selvagem e do gene ALS mutante foram preparadas como a seguir. O cDNA parcial derivado do arroz (possuído pelo Japão) que exibe alta homologia com o gene ALS do milho foi utilizado como uma sonda neste exemplo.

(1) Determinação da sequência de nucleotídeos do cDNA parcial derivado do arroz (possuído pelo Japão) que exibe alta homologia com o gene ALS do milho.

Como uma parte do Projeto Genoma do Arroz realizado pela Society for Techno-innovation of Agriculture, Forestry and Fisheries e pelo National Institute of Agrobiological Sciences, as sequências de nucleotídeos parciais dos cDNAs do arroz (possuído pelo Japão) foram determinadas e um banco de dados das sequências parciais de nucleotídeos de cDNAs já foi estabelecida. Um clone de cDNA (Nº de acesso C72411) que é conhecido como uma sequência de nucleotídeos de aproximadamente 350 bp contido neste banco de dados mostrou alta homologia com o gene ALS do milho. O gene ALS do milho foi completamente sequenciado.

Este clone de cDNA (Nº de acesso C72411) foi obtido do National Institute of Agrobiological Sciences e a sequência de nucleotídeos foi determinada como a seguir. Aqui, o clone de cDNA compreendia um gene

homólogo ao ALS inserido dentro do pBluescript II SK+ e era capaz de se replicar de forma autônoma em *E. coli*.

Primeiro, um vetor plasmídeo que mantém o homólogo do ALS foi transformado em *E. coli* (DH5 α). As colônias brancas obtidas de uma placa foram cultivadas em líquido e então os plasmídeos foram extraídos das células através de técnicas padrão. Uma vez que o DNA do inserto foi inserido entre *Sall* e *NotI* (enzimas de restrição de sítios para clonagens múltiplas no vetor plasmídeo), o vetor foi digerido com as duas enzimas. O inserto foi confirmado através de eletroforese em agarose. Então, o vetor plasmídeo que mantém o homólogo ao ALS obtido foi purificado através de técnicas padrão utilizando, por exemplo, RNaseA, PEG e LiCl, seguidas pela reação de seqüenciamento utilizando iniciadores e um ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit. As condições para a reação da PCR seguiam os protocolos do fabricante. Os iniciadores utilizados aqui eram os iniciadores M13 e os iniciadores sintetizados projetados partindo da seqüência de nucleotídeo determinada. O produto da PCR resultante foi purificado através da precipitação com etanol e então a seqüência de nucleotídeos do mesmo foi determinada através de um seqüenciador ABI PRISM 310.

É sabido que o vetor plasmídeo que mantém o homólogo ao ALS contém um DNA inserido com um comprimento de 1,6 kb. O vetor plasmídeo que mantém o homólogo ao ALS obtido foi digerido com as enzimas de restrição *Sall* e *NotI* e então submetido à eletroforese. Como um resultado, uma banda de aproximadamente 3 kbp correspondente ao pBluescript II SK+ e uma banda de aproximadamente 1,6 kbp correspondente ao fragmento de DNA inserido foram detectadas (dados não mostrados). A seqüência de nucleotídeos inteira da parte do DNA inserido foi determinada e sua homologia com a seqüência de nucleotídeos do milho foi investigada. Como mostrado nas Figuras 18A e B, foi encontrada uma homologia de 84,7%. Uma vez que o homólogo do ALS foi determinado como sendo um cDNA parcial do gene ALS da variante possuída pelo Japão, o inserto de DNA cortado após a digestão com *Sall* e *NotI* foi utilizado como uma sonda. Ainda nas Figuras 18A e B, a primeira fileira é uma seqüência de nucleotí-

deos do cDNA do gene ALS da variante possuída pelo Japão; a segunda fileira é a do gene ALS do milho.

(2) Preparação do mRNA do mutante resistente e do tipo selvagem

Primeiro, o mutante resistente congelado com nitrogênio líquido
5 foi moído com um almofariz e um pilão e então moído finamente com uma
misturadora durante 30 segundos. O pó moído foi suspenso em um tampão
de extração [(Tris-HCl 100 mM pH 9,0, NaCl 100 mM, 1% em peso de SDS,
EDTA 5 mM): (β -mercaptoetanol): (fenol saturado com Tris) = 15:3:20] e
então agitado vigorosamente. Esta solução foi centrifugada a 12000 x g du-
10 rante 15 minutos e então o sobrenadante foi coletado. Duzentos mL de PCI
[(fenol saturado com Tris): (clorofórmio): (álcool isoamílico) = 25:24:1] foram
adicionados ao sobrenadante, agitados a 4°C durante 10 minutos, centrfu-
gados a 12000 x g durante 15 minutos e então o sobrenadante foi coletado.
O procedimento foi repetido duas vezes. Um volume de 1/20 de NaCl 5 M e
15 um volume de 2,2 vezes de etanol foram adicionados ao sobrenadante obti-
do e então foi permitido que a mistura ficasse em repouso a -80°C durante
30 minutos. O precipitado foi coletado através da centrifugação a 12000 x g
durante 5 minutos. O precipitado foi lavado com 70% de etanol, seco e então
dissolvido em uma solução de β -mercaptoetanol a 10 mM. Depois, a solução
20 foi centrifugada a 27000 x g durante 10 minutos para remover a fração inso-
lúvel. Um volume de 1/4 de LiCl a 10 M foi adicionado à solução, que foi en-
tão permitida ficar em repouso no gelo durante 1 hora. Ainda, a solução foi
centrifugada a 27000 x g durante 10 minutos para coletar o precipitado, dis-
solvida em 4 mL de H₂O e então a absorbância a 260 nm foi medida para
25 descobrir a concentração de RNA. Um volume de 1/20 de NaCl 5 M e um
volume de 2,2 vezes de etanol foram adicionados na solução, que foi então
deixada em repouso a -80°C durante 30 minutos. Subseqüentemente a solu-
ção foi centrifugada a 27000 x g durante 10 minutos para coletar o precipita-
do, seguida pela lavagem com 70% de etanol e pela secagem. O produto
30 resultante foi dissolvido em uma quantidade apropriada de H₂O para a ob-
tenção de uma solução de RNA total. Aqui, a centrifugação foi realizada a
4°C.

O mRNA foi separado e purificado partindo do RNA total através do método a seguir. Um tampão de ligação 2x (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM, NaCl 1 M) em um volume equivalente ao da solução de RNA total extraído foi adicionado na solução de RNA total extraído. Uma coluna

5 preenchida com 0,1 g de oligo dT celulose (Amersham Bioscience) foi lavada com um tampão de ligação 1x e então a solução de RNA total foi aplicada à coluna. Após a coluna ter sido lavada com um tampão de ligação 1x, um tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM) foi aplicado e o eluato foi coletado 0,5 mL por vez. As frações que foram passadas através

10 da coluna foram aplicadas em outra coluna de oligo dT celulose (Amersham Bioscience) e tratadas da mesma maneira. Após a concentração do mRNA eluído ter sido calculada com base na absorbância de cada fração, um volume de 1/10 de LiCl 10 M e um volume de 2,5 vezes de etanol foram adicionados aos produtos e então foi permitido que as misturas ficassem em re-

15 pouso a -80°C durante 30 minutos. Depois, as misturas foram centrifugadas e as frações precipitadas foram secas e dissolvidas em 100 µL de H₂O. O mRNA obtido dessa forma foi submetido ao fracionamento por tamanho através de centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.

O mRNA separado e purificado foi aplicado em um tubo de cen-

20 trifuga com um gradiente de densidade fornecido por uma solução de sacarose de 25% e uma solução de sacarose de 5% e então ultracentrifugado a 27000 rpm durante 15 horas a 4°C utilizando um rotor de balanço. Após a centrifugação, 0,5 mL de cada fração foi coletado na ordem do gradiente de densidade. A absorbância de cada fração foi medida, a concentração do

25 mRNA coletado foi calculada e a presença do mRNA do ALS foi confirmada através da hibridização utilizando um kit de ECL (sistema de marcação e de detecção direta de ácidos nucléicos com ECL, Amersham Bioscience). A hibridização foi realizada utilizando uma sonda preparada em (1) anterior a

30 42°C durante 16 horas. Após a hibridização, foi realizada uma lavagem a 42°C durante 5 minutos duas vezes utilizando o tampão de lavagem primária fornecido com o kit e então foi realizada uma lavagem a 42°C durante 5 minutos uma vez utilizando uma solução de SSC x 2. O filme lavado foi envolto

com um filme plástico transparente para mantê-lo imerso em um reagente luminoso ligado fornecido com o kit e então exposto a um filme de raio X.

Quando a linhagem Sr foi utilizada como o mutante resistente, aproximadamente 35 mg de RNA total e aproximadamente 4 mg de mRNA puderam ser extraídos através dos procedimentos anteriores. Ainda, na centrifugação em gradiente de densidade de sacarose, foi encontrado um ponto positivo de hibridização para uma fração que era esperada como sendo positiva.

Quando o tipo selvagem foi utilizado, aproximadamente 95 mg do RNA total foi extraído em adição a aproximadamente 7 mg de mRNA. Quando o mRNA foi extraído do tipo selvagem, foi aplicado o método anterior exceto que o tipo selvagem foi utilizado ao invés do mutante resistente.

(3) Construção de bibliotecas de cDNA derivadas do mutante resistente e o tipo selvagem

Utilizando 2 µg do mRNA purificado em (2) acima e um kit de síntese de cDNA (Amersham Bioscience), o cDNA foi sintetizado, de forma que uma biblioteca de cDNA derivada do mutante resistente foi construída.

Primeiro, a RTase fornecida com o kit foi utilizada para uma reação de transcrição inversa; e a DNA polimerase do T4 fornecida com o kit foi utilizada para uma reação subsequente de alongamento da cadeia complementar. No momento da reação de alongamento da cadeia complementar, foi adicionado o ^{32}P -dCTP para calcular o rendimento da síntese de cDNA. Após ter sido utilizado um adaptador, o cDNA sintetizado foi incorporado no fago λ através de um método de empacotamento *in vitro*.

O adaptador adicionado ao cDNA era um adaptador *Eco* RI - *Not* I - *Bam* HI (Takara Shuzo). Os adaptadores com uma concentração molar 50 vezes maior que a do cDNA foram adicionados a uma solução contendo o cDNA. Então, o DNA ligase do T4 (Pharmacia) foi adicionado à mistura seguida pela reação de ligação a 4°C durante a noite. A solução de reação foi aplicada à HPLC utilizando uma coluna AsahiPak GS 710 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), seguida pelo monitoramento do eluato com raios ultravioleta a um comprimento de onda de 260 nm. O eluato foi fracionado em 25

frações de 0,5 mL cada. Cada fração foi medida com um contador Cerenkov e 3 até 4 frações com uma contagem alta foram coletadas. O terminal 5' do adaptador contido na fração foi fosforilado utilizando a polinucleotídeo quinase do T4 (Takara Shuzo) e então o braço *Eco* RI do λ gt 11 foi adicionado para realizar a ligação. O GigaPack Gold III (Stratagene) foi adicionado à solução e então a reação de ligação foi realizada à temperatura ambiente durante 2 horas. Após a reação, 200 μ L de um tampão SM e 8 μ L de clorofórmio foram adicionados à solução de reação, preparando assim uma solução de fagos. Esta solução de fagos foi diluída 10 vezes. Um μ L da solução diluída foi infectada com *E. coli* (Y-1088), à qual foi adicionado um ágar de superfície a 0,7% e então a solução foi inoculada sobre uma placa de LB. O número de placas que apareceram na placa 4 até 8 horas após foi contado, medindo assim o título.

A síntese de aproximadamente 74 ng de cDNA derivado da linhagem Sr foi confirmada através do resultado do papel DE 81 e da contagem de Cerenkov. O resultado da contagem de Cerenkov após a ligação de um vetor com um adaptador ligado ao mesmo revelou que aproximadamente 22 ng de λ DNA contido no inserto foram obtidos para a linhagem Sr. O λ DNA foi empacotado no fago, preparando assim uma biblioteca de cDNA derivada das células do mutante resistente. O título da solução da biblioteca era de 16600 pfu/ μ L.

Quando uma biblioteca de cDNA foi construída utilizando o mRNA do tipo selvagem de acordo com o método descrito anteriormente, foi mostrado que aproximadamente 38 ng do cDNA derivados do tipo selvagem tinham sido sintetizados. Ainda, aproximadamente 5 ng de λ DNA contidos no inserto foram obtidos para o tipo selvagem. Além disso, o título da solução da biblioteca de cDNA derivada do tipo selvagem era de 18160 pfu/ μ L.

(4) Seleção do cDNA contendo o gene ALS

Para formar aproximadamente 20.000 placas sobre as placas, a solução da biblioteca preparada em (3) acima foi diluída e então os fagos derivados do tipo selvagem e os derivados da linhagem Sr foram inoculados separadamente em 10 placas, respectivamente. As placas foram então

transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Schleicher & Schnell, PROTORGAN BA85, tamanho de poro 0,45 μm) e a membrana de nitrocelulose foi imersa em uma solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) e então em uma solução de neutralização (NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5), EDTA 1 mM) durante aproximadamente 20 segundos. A água em excesso foi removida da membrana de nitrocelulose utilizando um papel de filtro e então a membrana de nitrocelulose foi tratada termicamente a 80°C durante 2 horas. Aqui, a etapa de tratamento térmico foi omitida quando foi utilizada Hybond-N+ (Amersham Biotech) ao invés de uma membrana de nitrocelulose e a imobilização foi realizada com NaOH 0,4 M durante 20 minutos.

O inserto de DNA preparado em (1) acima foi marcado através de dois tipos de métodos, RI e sem ser com RI e então utilizado como uma sonda de DNA. A marcação com RI e a hibridização foram realizadas através do método a seguir. Primeiro, aproximadamente 200 até 500 ng de sonda de DNA foram desnaturados por calor e então marcados utilizando um kit de marcação de DNA BcaBEST (Takara Shuzo). No momento desta reação de marcação, um tampão, iniciadores aleatórios e ^{32}P -dCTP fornecidos com o kit foram adicionados. Depois, foi adicionado o BcaBEST, seguido pela incubação a 65°C durante 30 minutos. Subseqüentemente, o EDTA foi adicionado para interromper a reação. A solução de reação foi aplicada em membranas de nitrocelulose, de forma que 8 das membranas continham aproximadamente 100 ng das sondas. A hibridização foi realizada a 42°C durante a noite com agitação fraca. Após a hibridização, as membranas foram lavadas três vezes com SSC x 2, solução de SDS a 0,1%, seguidas pela exposição durante aproximadamente 1 hora a uma placa formadora de imagem de um analisador de imagens BAS 2000 (Fuji Photo Film). Após a exposição, os clones positivos foram detectados utilizando o analisador de imagens.

A marcação sem ser com RI foi realizada através do método a seguir. Após a desnaturação térmica de aproximadamente 200 até 500 ng de sonda de DNA, o reagente de marcação de DNA (peroxidase) e o gluta-

raldeído que foram fornecidos com um sistema de marcação e detecção de DNA/RNA direto de ECL (Amersham Bioscience) foram adicionados, seguidos pela incubação a 37°C. Neste caso, a sonda de DNA marcada foi aplicada nas membranas de nitrocelulose, de forma que 8 das membranas continham aproximadamente 100 ng da sonda de DNA marcada. A hibridização foi realizada a 42°C durante a noite com agitação fraca. Após a hibridização, a membrana foi lavada três vezes com um tampão de lavagem primária à temperatura ambiente durante 10 minutos e então uma vez com SSC x 2 à temperatura ambiente durante 10 minutos. A membrana foi imersa em uma solução luminosa fornecida com o kit ECL e então exposta a um filme de raio X durante 30 minutos até 3 horas.

Os fagos positivos obtidos através da hibridização (seleção primária) foram raspados juntos com o ágar de superfície utilizando um palito de dentes esterilizado e então suspensos em 200 µL de tampão SM, obtendo assim uma solução de fago. As soluções de fagos de cada clone foram diluídas de forma apropriada, infectadas com a cepa de *E. coli* Y-1088 e então inoculadas em placas de LB. Utilizando estas placas recém-preparadas, a hibridização (seleção secundária) foi realizada de forma similar. Os fagos positivos foram suspensos em 200 µL de um tampão SM, obtendo assim fagos individuais. Se nenhum único fago tivesse sido isolado pela seleção secundária, era realizada uma outra diluição, seguida pela incubação em placas de LB. Subseqüentemente, a hibridização (a terceira seleção) foi realizada, de forma que fagos isolados foram obtidos.

Depois, o λDNA foi preparado partindo dos fagos individuais através dos métodos a seguir. Os fagos λ coletados com um espeto de bambu ou um palito de dentes das placas de clones positivos foram inoculados em 200 µL de um meio 2xYT (contendo MgCl₂ 10 mM e 0,2% de maltose) contendo 5 µL de uma suspensão de *E. coli* (Y1088) hospedeira fresca. Foi permitido que o produto ficasse em repouso e incubado a 42°C durante a noite. Então, o meio foi inoculado novamente em 1 mL de um meio 2xYT (contendo MgCl₂ 10 mM e maltose 0,2%) contendo 25 µL de uma suspensão de *E. coli* (Y1088) hospedeira e então foi cultivado sob agitação durante a

noite (estas etapas compõem um processo de pré-cultivo). A solução pré-cultivada (10 até 50 μ L) foi inoculada em 12 mL de meio 2xYT contendo $MgCl_2$ 10 mM e 0,5 mL de suspensão de *E. coli* Y1088. Então, a incubação foi realizada a 42°C durante a noite com agitação relativamente forte, até

5 que a turvação aumentasse após a lise. Após o cultivo, 50 μ L de clorofórmio e 1,2 mL de NaCl 5 M foram adicionados e então a incubação foi realizada a 42°C durante 10 minutos durante agitação. O produto foi centrifugado a 27000 x g durante 10 minutos e então o sobrenadante foi novamente transferido para um tubo de centrifugação. Cinco mL de PEG 50% foram adicionados ao sobrenadante e foram então incubados em gelo durante 1 hora ou

10 mais. O produto foi centrifugado a 27000 x g durante 10 minutos e então o sobrenadante foi descartado. Depois, uma outra centrifugação foi realizada a 27000 x g e então a parte líquida foi descartada. A fração precipitada foi suspensa em 300 μ L de um tampão de Tris ácido clorídrico 30 mM (pH 7,5)

15 contendo 4 μ g de DNase I, 20 μ g de RNase A e $MgCl_2$ 10 mM. A suspensão foi transferida para um tubo de 1,5 mL. Após a incubação da suspensão a 37°C durante 30 minutos, 7,5 μ L de SDS a 20%, 3 μ L de proteinase K (10 mg/mL) e 12 μ L de EDTA 0,5 M foram adicionados à suspensão, seguidos pela incubação adicional a 55°C durante 15 minutos. Subseqüentemente,

20 150 μ L de fenol foram adicionados ao produto e então agitados vigorosamente. Então a mistura foi centrifugada a 15000 rpm durante 3 minutos utilizando uma TOMY Microcentrifuge MR-150 (TOMY DIGITAL BIOLOGY) e foi coletada uma camada aquosa. 800 μ L de éter etílico (ao qual a água destilada foi adicionada para remover o peróxido) foram adicionados à camada aquosa coletada. A mistura foi agitada vigorosamente e então centrifugada a 15000 rpm durante 10 segundos e a camada de éter foi descartada. Após a extração do éter a etapa foi repetida, o éter remanescente na

25 camada aquosa foi removido com gás de nitrogênio. Trinta μ L de NaCl 5 M e 875 μ L de etanol foram adicionados à camada aquosa, de forma que o

30 λ DNA precipitado foi rapidamente coletado. O λ DNA coletado foi lavado com aproximadamente 1 mL de etanol 70% e então seco sob pressão reduzida durante aproximadamente 1 minuto, removendo assim o etanol. O produto

foi dissolvido em 20 μL até 50 μL de um tampão TE (pH 8,0), preparando assim uma solução de λDNA .

A subclonagem e o seqüenciamento do inserto de DNA no λDNA obtido foram realizadas através do método a seguir. A solução de λDNA obtida (1 μL) foi digerida com *Not* I de forma que cortasse o inserto de DNA. A composição de uma solução de reação (para a reação de clivagem) foi sucedida pelo procedimento no manual que veio junto com a enzima de restrição. Após a reação a 37°C durante aproximadamente 2 horas, o tamanho do inserto foi confirmado por eletroforese utilizando gel de agarose a 1%. O λDNA (10 μL até 20 μL) contendo o inserto de DNA foi digerido com *Not* I, de forma a cortar o inserto de DNA. O inserto de DNA foi separado utilizando gel de agarose para a divisão proporcional, a banda correspondente foi clivada do gel e então o inserto de DNA foi purificado através de técnicas padrão. O inserto de DNA foi misturado com um vetor após o tratamento com BAP (desfosforilação utilizando a fosfatase alcalina derivada de um camarão) a uma proporção molar de 1:1, seguido pela reação de ligação com a DNA ligase do T4 a 16°C durante 2 horas ou mais. Aqui, uma vez que o inserto de DNA clivado com *Not* I foi utilizado como material, o tratamento com BAP foi realizado para os vetores clivados com *Not* I. Após a ligação, parte da solução foi misturada com células competentes (DH5 α) e então foi permitido que ficassem em repouso no gelo durante 30 minutos. Depois, a mistura foi submetida ao choque térmico a 42°C durante 30 segundos e então foi permitido que ficasse em repouso no gelo mais uma vez durante 2 minutos. Então, foi adicionado SOC à mistura, incubada a 37°C durante 1 hora, inoculada em uma placa de meio LB sobre a qual uma mistura de 100 μL de 2xYT (contendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina), 30 μL de X-Gal a 3% e 3 μL de IPTG 1 M tinham sido anteriormente adicionados de forma uniforme e então cultivados a 37°C durante 10 horas ou mais. As colônias brancas transformadas foram cada uma inoculada em 2 mL de um meio LB contendo ampicilina ou um meio 2x YT e então cultivadas a 37°C durante a noite. Partindo da solução de cultura, os plasmídeos foram preparados através de técnicas padrão e dissolvidos em H_2O . A concentração de DNA dos mesmos foi

quantificada e então os plasmídeos foram submetido à reação da PCR para seqüenciamento. A reação da PCR e o seqüenciamento foram realizados através de métodos descritos acima.

Como um resultado do experimento anterior, o cDNA do ALS
5 com um comprimento incompleto de aproximadamente 2,2 kb foi obtido partindo das células de cultura de cada um do tipo selvagem e da linhagem Sr. Uma vez que um sítio de *Sma* I estava presente em uma posição de aproximadamente 250 bp partindo do lado a 5' do DNA, foi preparada uma nova sonda através do método a seguir. O pBluescript II SK+ que mantém o
10 cDNA do ALS com um comprimento incompleto de aproximadamente 2,2 kbp derivado do tipo selvagem foi amplificado com *E. coli* JM109 hospedeira e então os plasmídeos foram extraídos utilizando um sistema de isolamento automatizado (KURABO PI-100). O plasmídeo foi digerido diretamente com *Sma* I. O fragmento gerado de aproximadamente 250 bp foi separado e purificado através de eletroforese em agarose a 1% e então a concentração foi
15 calculada, preparando assim uma sonda. Utilizando a sonda, a biblioteca foi selecionada novamente através do método acima que em emprega o RI anterior. O λ DNA foi preparado partindo dos fagos individuais obtidos dessa forma, a solução de λ DNA (1 μ L) foi digerida com *Eco* RI e então o tamanho foi confirmado através de eletroforese, seguida pela imobilização em uma membrana de nitrocelulose. Após a eletroforese, o gel foi imerso em uma solução de NaOH 0,5 M contendo NaCl 1,5 M e então agitado ligeiramente durante 15 minutos. O gel foi então lavado com água, imerso em Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5) contendo NaCl 3 M e então neutralizado enquanto era agitado
20 durante aproximadamente 15 minutos. Papéis de filtro industriais com espessura de aproximadamente 5 foram empilhados para produzir uma base. A base foi colocada em SSC x 2 espalhado sobre uma cuba de aço inoxidável. Subseqüentemente, o gel neutralizado, uma membrana de nitrocelulose (que foi cortada em um certo tamanho, imersa em água destilada e
25 então imersa em SSC x 2 durante mais 10 minutos) e os papéis de filtro de duas camadas foram colocados em ordem sobre a base, sobre qual um papel toalha com uma espessura de 3 cm até 4 cm foi também colocado. Uma

placa de vidro e então um peso leve foram colocados sobre o produto, seguidos pelo "blotting" durante aproximadamente 5 minutos. Após a conformação de que não havia bolhas retidas entre o gel e a membrana, o "blotting" foi realizado durante aproximadamente 10 minutos. Após o "blotting", a membrana foi submetida a um tratamento com UV com um transiluminador e então tratada termicamente a 80°C durante aproximadamente 15 minutos até 30 minutos. Após o tratamento térmico, a hibridização (composição do tampão para hibridização: SSPE x 5, SDS 0,5%, Denharlts x 5, DNA de esperma de solum, formamida 50%) foi realizada com a sonda de DNA de 250 bp acima marcada com ³²P. A radiação da banda de hibridização foi transferida para uma placa formadora de imagem e o resultado foi analisado com BAS-2000. Entre os insertos positivos na hibridização, os que exibiam um tamanho relativamente grande foram preparados em grande quantidade e então subclonados no pBluescript II SK+ que tinha sido digerido com *Eco* RI e então tratado com BAP através do método anterior. O produto foi transformado em *E. coli* (JM 105). Os transformantes obtidos foram submetidos ao cultivo líquido e então os plasmídeos foram preparados através de técnicas padrão. Assim, a seqüência de nucleotídeos foi determinada através dos métodos anteriores.

Como um resultado, o gene de cDNA do ALS de comprimento completo podia ser obtido partindo das células de cultura de cada um do tipo selvagem e da linhagem Sr. Os resultados das comparações de homologia entre os genes ALS do tipo selvagem e do mutante são mostrados nas Figuras 19A, B e C. Como mostrado nas Figuras 19A, B e C, comparados ao tipo selvagem, foram observadas 2 mutações pontuais na linhagem Sr em 2 pontos, no 1643^o e no 1880^o, partindo da primeira base A como o ponto de partida do códon de início da transcrição ATG. Na linhagem Sr, o 1643^o G no tipo selvagem foi mutado para T (denominado como G1643T) e o 1880^o G no tipo selvagem foi mutado para T (denominado como G1880T). Quando convertidas em aminoácidos, estas mutações indicavam que a proteína ALS mutante da linhagem Sr possuía uma seqüência de aminoácidos em que o 548^o triptofano na proteína ALS do tipo selvagem tinha sido mutado para

leucina (ou seja, "mutação W548L") e a 627^a serina na proteína ALS do tipo selvagem tinha sido mutada para isoleucina (ou seja, "mutação S627I").

(5) Subclonagem do cDNA do ALS do tipo selvagem clonado no pBluescript II SK+ no pGEX 2T

- 5 Após o plasmídeo pBluescript II SK+ que possuía o cDNA do ALS do tipo selvagem de comprimento completo obtido em (4) acima incorporado no mesmo ter sido digerido com *Eco* RI, o cDNA contendo o gene ALS do tipo selvagem foi cortado. Então, o cDNA foi incorporado no sítio *Eco* RI do pGEX-2T (Amersham Bioscience), que é um vetor de expressão de *E.*
- 10 *coli*. Posteriormente aqui, um vetor de expressão que possui o cDNA do ALS de comprimento completo incorporado no sítio *Eco* RI do pGEX-2T é referido como "pGEX-2T(ALS-tipo selvagem)". O pGEX-2T(ALS-tipo selvagem) foi transformado em *E. coli* (JM 109). As colônias obtidas através da transformação foram cultivadas em líquido, os plasmídeos foram extraídos e então a
- 15 direção da inserção do inserto de DNA foi confirmada através do seqüenciamento. Assim, a *E. coli* (JM109) transformada com o pGEX-2T(ALS-tipo selvagem) foi preparada.

[Exemplo 4] Elucidação dos sítios de mutação no gene ALS de células em cultura de arroz resistentes aos herbicidas de PC

- 20 (1) Extração do DNA genômico do mutante resistente (cepas das linhagens Sr, Rb, Vg e Ga)

- Utilizando um kit de extração de DNA vegetal ISOPLANT II (Nippon Gene), o DNA genômico foi extraído de 0,1 g de células cultivadas de cada uma das linhagens Sr, Rb, Vg e Ga de acordo com os protocolos que
- 25 vieram no kit. Após o DNA genômico ter sido extraído utilizando o kit acima, o RNA foi desnaturado e removido utilizando a RNase A. Então, a eletroforese em gel de agarose foi realizada, confirmando assim o DNA genômico.

(2) PCR do gene ALS utilizando o DNA genômico como molde

- A PCR foi realizada utilizando cada um dos DNAs genômicos
- 30 como um molde e um iniciador "ALS-Rsp3" e um iniciador "4-83-3", como mostrado abaixo. A PCR foi realizada utilizando Ready to Go PCR Beads (Amersham Bioscience) em um volume final de 25 µL. A reação foi realizada

durante 40 ciclos, cada condição dos ciclos consistindo em uma etapa de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos, seguida por uma etapa de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, uma etapa de anelamento a 55°C durante 1 minuto e uma etapa de alongamento a 72°C durante 2 minutos. Em adição, a etapa de alongamento no ciclo final foi realizada a 72°C durante 9 minutos.

Depois, a solução da reação da PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2% (100 V, tampão TBE 1 X). Os géis contendo os produtos da PCR foram cortados e então os géis cortados foram cortados em fragmentos pequenos. Os fragmentos de gel obtidos foram lavados duas vezes ou três vezes com água com troca iônica esterilizada, 500 µL de água de troca iônica esterilizada foram adicionados e então o congelamento e a dissolução foram repetidos três vezes. Assim, o produto da PCR podia ser eluído em água.

Depois, a PCR foi realizada novamente utilizando o eluato em que o produto da PCR foi dissolvido. Especificamente, esta PCR foi realizada em um volume final de 100 µL utilizando o produto da PCR contido na solução como um molde e o mesmo conjunto de iniciadores ou iniciadores contidos. Após a reação, a solução de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose (1%) para a divisão proporcional. Os géis contendo as bandas alvo foram cortados e então purificados utilizando um GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (Amersham Bioscience). Finalmente, o produto da PCR foi eluído utilizando 75 µg de água desionizada esterilizada.

(3) Seqüenciamento

A reação de seqüência foi realizada utilizando o fragmento de DNA amplificado pela PCR como um molde e ABI PRISM BigDye ver. 2 (Applied Biosystem). Para a reação de seqüência, 11 µL do DNA molde, 1 µL do iniciador (3,2 pmoles/µL) e 8 µL da pré-mistura foram misturados, portanto, o volume total era de 20 µL. A reação de seqüência foi realizada durante 40 ciclos, cada condição dos ciclos consistindo em uma etapa de desnaturação inicial a 96°C durante 5 minutos, seguida por uma etapa de desnaturação a 96°C durante 5 segundos, uma etapa de anelamento a 50°C

durante 5 segundos e uma etapa de alongamento a 60°C durante 4 minutos. Em adição, a etapa de alongamento do ciclo final foi realizada a 60°C durante 9 minutos. Após a reação de seqüência, os nucleotídeos fluorescentes na solução de reação foram removidos através de filtração em gel utilizando a coluna AutoSeq G-50 (Amersham Biotech). Então as seqüências de nucleotídeos foram lidas utilizando o seqüenciador de DNA ABI PRISM 310.

(4) Nomes dos iniciadores e as seqüências de nucleotídeos utilizados aqui

Os nomes, as seqüências de nucleotídeos e similares de iniciadores utilizados em (2) acima e de iniciadores utilizados nos exemplos a seguir estão listados na Tabela 6.

Tabela 6

Nome	Sequência de nucleotídeos	Direção	Sítio do ALS correspondente	Número de bases
ALS-Rsp1	5'-GCTCTGCTACACACAGACACA-3'	sentido	1192-1212	21 mer
ALS-Rsp2	5'-AGTCCTGCCATCACCATCCAG-3'	anti-sentido	1906-1926	21 mer
ALS-Rsp3	5'-CTGGGACACCCTCGATGAAT-3'	sentido	720-738	19 mer
ALS-Rsp4	5'-CAACAAACCAGCGCAATTCGTACCC-3'	anti-sentido	862-886	25 mer
ALS-Rsp6	5'-CATCACCACAACCACCTCTT-3'	sentido	327-344	18 mer
ALS-Rsp7	5'-AACTGGGATACCAGTCAGCTC-3'	anti-sentido	886-906	21 mer
ALS-RspA	5'-TGTGCTTGGTGATGA-3'	anti-sentido	571-586	16 mer
ALS-RspB	5'-TCAAGGACATGATCCTGGATGG-3'	sentido	1913-1944	16 mer
ALS-RspC	5'-CAGCGACGTGTTGCCCTA-3'	sentido	258-275	16 mer
ALS-RspD	5'-CCACCCGACATAGAGAAATC-3'	anti-sentido	828-845	18 mer
ALS-RspF	5'-ACACGGACTGCAGGAATA-3'	anti-sentido	1749-1766	18 mer
ALS-RspE	5'-TTACAAGGGCAATAGGGC-3'	sentido	1656-1673	18 mer
3-1-1	5'-GCATCTTCTTGATGGCG-3'	anti-sentido	1791-1807	17 mer
3-1-2	5'-ATGCATGGCAGCGGTGAC-3'	sentido	973-990	18 mer
3-1-3	5'-GATTGCCCTCACCTTTCG-3'	anti-sentido	1346-1362	17 mer
3-1-4	5'-AGGTGTCACAGTTGTTG-3'	sentido	1506-1522	17 mer
4-83-1	5'-AGAGGTGTTGGTGATG-3'	anti-sentido	327-343	17 mer
4-83-3	5'-GCTTTGCCAACATACAG-3'	anti-sentido	1944-1960	17 mer
4-83-10	5'-CAGCCCAATCCCATTTG-3'	anti-sentido	1457-1473	17 mer
4-83-15	5'-ATGTACCCTGGTAGATTTC-3'	anti-sentido	735-752	18 mer
ALS-DG7	5'-GTITT(CT)GCITA(CT)CCIGG(ACGT)GG-3'	sentido	265-284	20 mer

Na Tabela 6, o sítio do ALS correspondente é o número de uma base correspondente quando o códon de início da transcrição (ATG) é o ponto de partida. Em adição, a sequência de nucleotídeos de ALS-Rsp1 é mostrada na SEQ ID Nº: 9, a sequência de nucleotídeos de ALS-Rsp2 é mostrada na SEQ ID Nº: 10, a sequência de nucleotídeos de ALS-Rsp3 é mostrada na SEQ ID Nº: 11, a sequência de nucleotídeos de ALS-Rsp4 é mostrada na SEQ ID Nº: 12, a sequência de nucleotídeos de ALS-Rsp6 é mostrada na SEQ ID Nº: 13, a sequência de nucleotídeos de ALS-Rsp7 é mostrada na SEQ ID Nº: 14, a sequência de nucleotídeos de ALS-RspA é mostrada na SEQ ID Nº: 15, a sequência de nucleotídeos de ALS-RspB é mostrada na SEQ ID Nº: 16, a sequência de nucleotídeos de ALS-RspC é mostrada na SEQ ID Nº: 17, a sequência de nucleotídeos de ALS-RspD é mostrada na SEQ ID Nº: 18, a sequência de nucleotídeos de ALS-RspF é mostrada na SEQ ID Nº: 19, a sequência de nucleotídeos de ALS-RspE é mostrada na SEQ ID Nº: 20, a sequência de nucleotídeos de 3-1-1 é mostrada na SEQ ID Nº: 21, a sequência de nucleotídeos de 3-1-2 é mostrada na SEQ ID Nº: 22, a sequência de nucleotídeos de 3-1-3 é mostrada na SEQ ID Nº: 23, a sequência de nucleotídeos de 3-1-4 é mostrada na SEQ ID Nº: 24, a sequência de nucleotídeos de 4-83-1 é mostrada na SEQ ID Nº: 25, a sequência de nucleotídeos de 4-83-3 é mostrada na SEQ ID Nº: 26, a sequência de nucleotídeos de 4-83-10 é mostrada na SEQ ID Nº: 27, a sequência de nucleotídeos de 4-83-15 é mostrada na SEQ ID Nº: 28 e a sequência de nucleotídeos de ALS-DG7 é mostrada na SEQ ID Nº: 29.

(5) Mutações em cada linhagem reveladas como um resultado do seqüenciamento

Como um resultado da análise das seqüências de nucleotídeos determinadas em (3) acima, foram reveladas as mutações nas linhagens Rb, Vg, Ga e Sr. Os pontos mutados de cada linhagem estão listados na Tabela 7.

Tabela 7

Base mutante	C512A	C514A	G1643T	G1880T
Aminoácido mutante	P171H	R172S	W548L	S627I
Linhagem Rb	o homo		o hétero	
Linhagem Vg			o hétero	
Linhagem Ga	o homo ou hétero	o homo ou hétero	o hétero	
Linhagem Sr			o hétero	o hétero

Como mostrado na Tabela 7, na seqüência de nucleotídeos da cepa da linhagem Rb, a 512^a C foi mutada para A (homo) e a 1643^a foi mutada para T (hétero). Isto significa que no nível de aminoácido, a 171^a prolina e o 548^o triptofano (W) foram mutados para histidina (H) e leucina (L), respectivamente. Na seqüência de nucleotídeos da cepa da linhagem Vg, a 1643^a G foi mutada para T (hétero), sugerindo que no nível de aminoácido, o 548^o triptofano (W) foi mutado para leucina (L). Na seqüência de nucleotídeos da cepa da linhagem Ga, a 512^a e a 514^a C foram mutadas para A (homo ou hétero) (estes tipos diferiam dependendo do produto da PCR obtido) e a 1643^a G foi mutada para T (hétero). Isto significa que no nível de aminoácido, a 171^a prolina (P), a 172^a arginina (R) e o 548^o triptofano (W) foram mutados para histidina (H), serina (S) e leucina (L), respectivamente. Ainda, na seqüência de nucleotídeos da cepa da linhagem Sr, a 1643^a e a 1880^a G foram mutadas para T (hétero).

Quando os genes ALS foram selecionados e isolados da biblioteca de cDNA da cepa da linhagem Sr através do método anterior, não somente um gene mutante de dois pontos, mas também um gene do tipo selvagem foi isolado. Assim, foi assumido que no nível do DNA genômico, ocorreu uma mutação heteróloga e os resultados obtidos pela PCR do genoma também sustentaram esta suposição.

Como descrito anteriormente, em todos os mutantes resistentes o 548^o triptofano (W) foi mutado para leucina (L) (hétero) e a linhagem Vg

possuía somente esta mutação. Como descrito anteriormente, a cepa da linhagem Vg exibia sensibilidade a até 10 µM de bispiribac-sódio e as cepas das linhagens Sr, Rb e Ga exibiam a mesma a até 100 µM de bispiribac-sódio. Conseqüentemente, foi sugerido que a aquisição da resistência co-
 5 meçou partindo da linhagem Vg e se ramificou em outras linhagens e mutou, à medida que a intensidade da pressão seletiva aumentou.

[Exemplo 5] Síntese de cDNAs do ALS possuindo independentemente a mutação G1643T(W548L) ou a mutação G1880T(S627I), construção de pGEX 2T que mantém os cDNAs do ALS e transformação de *E. coli* utilizando o vetor
 10

Primeiro, a síntese dos cDNAs do ALS possuindo independentemente a mutação G1643T(W548L) ou a mutação G1880T(S627I) e a construção do pGEX 2T que mantém os cDNAs do ALS são descritos utilizando a Figura 20.

15 A PCR foi realizada em um volume de reação final de 100 µL utilizando 1 µL (585 ng/µL e 554 ng/µL, respectivamente) de pBluescript II SK+ (mutante do ALS em 2 pontos) ou do pBluescript II SK+ (ALS do tipo selvagem) como um molde e 1 µL da DNA polimerase LA Taq (Takara). A reação foi realizada durante 25 ciclos, cada condição dos ciclos consistindo
 20 em 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos e 72°C durante 2 minutos. Ainda, o pBluescript II SK+ (mutante do ALS em 2 pontos) continha o gene ALS mutante em dois pontos, G1643T(W548L) e G1880T(S627I). O pBluescript II SK+ (ALS do tipo selvagem) continha o gene ALS do tipo selvagem que não possuía qualquer mutação. Para a PCR, uma combinação
 25 dos iniciadores ALS-Rsp6 e ALS-RspF e uma combinação dos iniciadores ALS-RspE e M13R foram utilizadas. Os nomes dos fragmentos amplificados utilizando os genes ALS como um molde e a combinação fornecida de iniciadores estão listados na Tabela 8. Em adição, o iniciador M13R é um iniciador anti-sentido na vizinhança do promotor T3 do pBluescript II SK+. Ainda,
 30 a seqüência de nucleotídeos do M13R é 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' (SEQ ID Nº: 30).

Tabela 8

	pBluescript II SK+ (mutante do ALS em dois pontos)	pBluescript II SK+ (ALS do tipo selvagem)
ALS-Rsp6 ALS-RspF	PCR-1	PCR-3
ALS-RspE M13R	PCR-2	PCR-4

O PCR-1, o PCR-2, o PCR-3 e o PCR-4 obtidos através da PCR foram respectivamente submetidos à eletroforese em gel de agarose para separação e então os produtos foram coletados de uma maneira similar à do método anterior partindo do gel de agarose e então os produtos foram eluídos com 50 µL de água esterilizada.

Depois, um conjunto do PCR-1 e do PCR-4 e um conjunto do PCR-2 e do PCR-3 foram submetidos à SPR (reação da própria polimerase). A SPR foi realizada através da adição de 23,5 µL do conjunto do PCR-1 e do PCR-4 ou do conjunto do PCR-2 e do PCR-3 e 1 µL da DNA polimerase LA Taq até um volume final 75 µL e realizando 25 vezes um ciclo consistindo em uma etapa de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, uma etapa de anelamento a 55°C durante 30 segundos e uma etapa de alongamento a 72°C durante 2 minutos. Os fragmentos de DNA obtidos através da SPR utilizando o conjunto do PCR-1 e do PCR-4 foram considerados como SPR-1 e os fragmentos de DNA obtidos através da SPR utilizando o conjunto do PCR-2 e do PCR-3 como SPR-2.

Ainda, neste exemplo, para assegurar uma quantidade suficiente de SPR-1 e de SPR-2, a PCR foi respectivamente realizada em um volume de reação final de 100 µL utilizando SPR-1 e SPR-2 purificados como um molde, ALS-Rsp6 e M13R e a DNA polimerase LA Taq novamente. A PCR neste caso foi realizada através da repetição de 25 vezes um ciclo consistindo em uma etapa de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, uma etapa de anelamento a 55°C durante 30 segundos e uma etapa de alongamento a 72°C durante 2 minutos. Após a PCR, a solução de reação foi submetida à

eletroforese em gel de agarose. Uma única banda de aproximadamente 2 kbp (produto da PCR) foi coletada do gel de agarose e então diluída com 100 μ L de água esterilizada.

Depois, o SPR-1 e o SPR-2 amplificados pela PCR foram respectivamente digeridos com *Acc I* e *Eco RI*, obtendo assim o SPR-1 (fragmento digerido com *Acc I/Eco RI*) e o SPR-2 (fragmento digerido com *Acc I/Eco RI*). Especificamente, 50 μ L da água esterilizada (100 μ L no total) contendo o produto da PCR dissolvido ali foram misturados com 1 μ L de *Acc I* (12 u/ μ L) e 1 μ L de *Eco RI* (12 u/ μ L) na presença do tampão M 10 x (Takara), seguidos pela incubação em um volume final de 60 μ L a 37°C durante 1 hora. Depois disso, o volume total da solução de reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose e então um fragmento alvo de 1,5 kbp foi coletado utilizando um GFX PCR and Gel Purification Kit. O fragmento de 1,5 kbp coletado foi eluído com 50 μ L de água esterilizada, de forma que uma solução contendo o SPR-1 (fragmento digerido com *Acc I/Eco RI*) e uma solução contendo o SPR-2 (fragmento digerido com *Acc I/Eco RI*) foram preparadas.

Enquanto isso, 150 μ L de um vetor de expressão de proteína possuindo o gene ALS do tipo selvagem incorporado no mesmo, plasmídeo pGEX-2T (ALS do tipo selvagem) (concentração de aproximadamente 50 ng/ μ L), foram misturados com 1 μ L de *Acc I* (12 u/ μ L, Takara) na presença do tampão M 10 X, seguido pela incubação a 37°C durante 2 horas. Após a reação, uma banda linear de 7,2 kbp foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose a 1%. De acordo com os protocolos do GFX PCR and Gel Purification Kit, o DNA correspondente à banda de 7,2 kbp foi coletado do gel de agarose e então o produto foi eluído com 180 μ L de água esterilizada. 89 μ L do produto eluído foram misturados com 10 μ L do tampão H 10 x (Takara) e 1 μ L de *Eco RI* (12 u/ μ L) e então foi permitido que reagissem a 37°C durante 1 minuto, digerindo assim parcialmente o DNA coletado dessa forma com *Eco RI*. Após a reação, foi adicionado o tampão de carga 10 x e então foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Bandas de 4,9 kbp, 5,7 de kbp e 6,5 de kbp e uma banda de 7,2 kbp que não foi clivada de

forma alguma apareceram separadamente e então a banda alvo de 5,7 kbp foi cortada do gel. Um fragmento de DNA de aproximadamente 5,7 kbp contido no gel cortado foi coletado utilizando o GFX PCR and Gel Purification Kit e então o produto foi eluído com 50 µL de água esterilizada.

- 5 Subseqüentemente, 3 µL dos fragmentos digeridos com *Acc I* e parcialmente digeridos com *Eco RI* do pGEX-2T (ALS do tipo selvagem) obtido dessa forma e 3 µL do SPR-1 (fragmento digerido com *Acc I/Eco RI*) foram respectivamente permitidos que reagissem em 6 µL de tampão de ligação Takara (ver. 2, solução I) a 16°C durante a noite.
- 10 Então, a solução de reação foi transformada em células competentes de *E. coli* (cepa JM109, Takara) de acordo com os protocolos que vieram junto com a mesma. As células foram inoculadas em meio LB contendo 50 ppm de ampicilina e então incubadas a 37°C durante a noite. Como um resultado, várias das colônias que apareceram foram selecionadas. A
- 15 PCR foi realizada diretamente utilizando as colônias como um molde e o conjunto de ALS-RspE descrito na Tabela 6 e o PGEX-3 (5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3': SEQ ID Nº: 31), o conjunto do PGEX-5 (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3': SEQ ID Nº: 32) e do PGEX-3 e o conjunto do PGEX-5 e ALS-RspA descrito na Tabela 6. Em adição, o PGEX-
- 20 3 possuía uma seqüência que era a mesma que a de uma parte de um filamento anti-sentido localizado no lado a 3' do pGEX-2T utilizado como um vetor. O PGEX-5 possuía uma seqüência que era a mesma que a de uma parte de um filamento sentido localizado no lado a 5' do pGEX-2T utilizado como um vetor. Como a condição de reação para o conjunto ALS-
- 25 RspE/PGEX-3, cada 1 µM de iniciador e 1 esfera da PCR foram dissolvidos em um volume total de 25 µL e a reação foi realizada através da repetição 40 vezes de um ciclo que consistia em uma etapa de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, uma etapa de anelamento a 55°C durante 1 minuto e uma etapa de alongamento a 72°C durante 2 minutos. No caso do conjunto
- 30 PGEX-5/PGEX-3 e do conjunto PGEX-5/ALS-RspA, foi adicionado adicionalmente DMSO com uma concentração final de 5% na solução anterior, devido à presença, em uma parte a montante, de uma região possuindo

aproximadamente 75% do teor de GC. Como um resultado desta PCR, a inserção de um inserto desejado foi confirmada.

Uma colônia para a qual a inserção de um inserto desejado foi confirmada foi coletada e então cultivada sob agitação em meio LB líquido (3 mL cada, 10 meios) contendo 50 ppm de ampicilina a 37°C durante 12 horas. Após o cultivo, os plasmídeos foram extraídos (400 até 500 µL) dos meios utilizando um sistema de extração de plasmídeos (TOMY, DP-480) e então concentrados até aproximadamente 200 µL por centrifugação. Então, o concentrado foi purificado e o sal foi retirado utilizando o GFX PCR and Gel Purification Kit e então finalmente eluído com aproximadamente 130 µL de água esterilizada.

A reação de seqüência foi realizada utilizando o ABI PRISM BigDye ver. 2 para estes plasmídeos, de forma que a seqüência de nucleotídeos do inserto no plasmídeo foi analisada. Para a reação de seqüência, a solução de reação foi preparada para possuir um volume total de 20 µL através da mistura de 11 µL de DNA molde, 1 µL de iniciador (3,2 pmoles/µL) e 8 µL de pré-mistura. Esta reação de seqüência foi realizada durante 40 ciclos, cada condição do ciclo consistindo em uma etapa de desnaturação a 96°C durante 5 minutos, uma etapa de desnaturação a 96°C durante 5 segundos, uma etapa de anelamento a 50°C durante 5 segundos e uma etapa de alongamento a 60°C durante 4 minutos e a etapa de alongamento do ciclo final foi realizada a 60°C durante 9 minutos. Após a reação de seqüência, os nucleotídeos fluorescentes na solução de reação foram removidos através da filtração em gel utilizando uma coluna AutoSeq G-50 e então a seqüência de nucleotídeos foi determinada utilizando o seqüenciador de DNA ABI PRISM 310.

Em adição, para a reação de seqüência, dos iniciadores descritos na Tabela 6, o PGEX-5, o ALS-RspC, o ALS-Rsp3, o ALS-Rsp1, o 3-1-4 e o ALS-RspB foram utilizados como iniciadores sentido e o 4-83-3, o PGEX-3, o ALSRsp2, o 4-83-10 e o ALS-Rsp7 foram utilizados como os iniciadores anti-sentido.

Como um resultado da análise, foi confirmado que o vetor pGEX

2T compreendendo o gene ALS mutante com a mutação W548L (descrito como "pGEX 2T(mutante W548L do ALS)" na Figura 20) e o vetor pGEX 2T compreendendo o gene ALS mutante com a mutação S627I (descrito como "pGEX 2T(mutante S627I do ALS)" na Figura 20) foram obtidos. Subseqüentemente, a *E. coli* foi transformada com estes pGEX 2T(mutante W548L do ALS) and pGEX 2T(mutante S627I do ALS).

[Exemplo 6] Síntese de cDNAs do ALS possuindo independentemente a mutação C512A (P171H) encontrada através da PCR do genoma para a linhagem Rb ou a mutação C514A (R172S) encontrada através da PCR do genoma para a linhagem Ga, a construção do pGEX 2T que mantém os cDNAs do ALS e transformação de *E. coli* com este vetor

Primeiro, a síntese dos cDNAs do ALS possuindo independentemente a mutação C512A (P171H) e a mutação C514A (R172S) e a construção do pGEX 2T que mantém os cDNAs do ALS são descritas nas Figuras 21 e 22.

Para a obtenção do fragmento de DNA mutante C512A (P171H), a PCR foi realizada utilizando o DNA genômico da linhagem Rb como um molde e um conjunto de iniciadores do ALS-Rsp6 e do ALS-Rsp4 descrito na Tabela 6. Especificamente, a PCR foi realizada utilizando Ready to Go PCR Beads através da adição de 5 µL do DNA genômico molde e 1 µL de cada iniciador (25 pmoles/µL) em um volume final de 25 µL. A condição de reação consistia em uma etapa de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguida por um ciclo (repetido 40 vezes) de uma etapa de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, uma etapa de anelamento a 55°C durante 1 minuto e uma etapa de alongamento a 72°C durante 2 minutos. Em adição, a etapa de alongamento do ciclo final foi realizada a 72°C durante 9 minutos.

Após a reação da PCR, a solução de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2%, uma banda do produto da PCR (descrita como "PCR-5" na Figura 21) foi cortada do gel de agarose e então purificada utilizando o GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit. Depois, o PCR-5 purificado foi incorporado no vetor T pT7Blue (Novagen), o vetor (vetor de clonagem de TA) para a clonagem do produto da PCR. Especifi-

camente, 1 µL do produto da PCR purificado foi misturado com 1 µL do vetor T pT7 Blue (50 ng/µL), 3 µL de água desionizada esterilizada e 5 µL do tampão de ligação (ver 2, solução I, Takara Shuzo) e então foi permitido que reagisse durante a noite a 16°C.

5 Após a reação, o volume total da solução de reação foi transformado em *E. coli* (JM109) de acordo com métodos padrão. Após o cultivo de *E. coli* em meio LB sólido contendo 50 ppm de ampicilina, as colônias possuindo uma seqüência alvo foram selecionadas das colônias isoladas que apareceram no meio de uma maneira similar à do Exemplo 5. As colônias
10 isoladas selecionadas foram cultivadas sob agitação em solução de cultura líquida de LB (3 mL, 10 meios) contendo 50 ppm de ampicilina a 37°C durante 12 horas. Após o cultivo, os plasmídeos foram extraídos (400 até 500 µL) utilizando um sistema de extração de plasmídeos (TOMY, DP-480). Os plasmídeos foram concentrados até aproximadamente 200 µL por centrifugação, purificados e os sais foram extraídos utilizando o GFX PCR e Gel
15 Purification Kit e então eluídos com aproximadamente 80 µL de água esterilizada.

Cinqüenta µL do eluato foram misturados com 1 µL de *Acc I* (12 u/µL) e 1 µL de *Sma I* (10 u/µL) na presença de 10 µL do tampão T 10 X e
20 10 µL de BSA a 0,1% para levar a um volume total de 100 µL e então a mistura foi incubada a 37°C durante 2 horas. Após a reação, a solução de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose, uma banda alvo foi cortada e coletada e então um fragmento de DNA foi coletado de acordo com os protocolos do GFX PCR e Gel Purification Kit. Assim, foi obtido o
25 fragmento de DNA mutante C512A (P171H) possuindo o sítio para *Sma I* e o sítio para *Acc I* em seus terminais.

Por outro lado, uma vez que as mutações C514A e C512A estavam próximas uma da outra, um fragmento de DNA possuindo somente a mutação C514A (R172S) não podia ser obtido através da PCR utilizando o
30 DNA genômico extraído da linhagem Gb como um molde. Assim, como mostrado na Figura 21, um fragmento de DNA possuindo somente uma mutação C514A (R172S) foi preparado utilizando um par de iniciadores ao qual

pontos mutados foram previamente introduzidos. Ou seja, a PCR foi realizada respectivamente utilizando iniciadores que possuíam pontos mutados introduzidos nos mesmos ALS-M1 (5'-CCCCAGCCGCATGATCGGCACCGA CGCCTT-3': SEQ ID N^o: 33, a A sublinhada é um ponto mutado) e ALS-M2
 5 (5'-CGGTGCCGATCATGCGGCIGGGGACCT-3': SEQ ID N^o: 34, a T sublinhada é um ponto mutado) e como um molde o pBluescript II SK+ que possui o cDNA do ALS do tipo selvagem incorporado no mesmo; e utilizando um conjunto de iniciadores do ALS-Rsp6 e do ALS-M2; e utilizando um conjunto de iniciadores do ALS-M1 e do ALS-Rsp4. Em adição, as partes complementares são a sequência de nucleotídeos (1^o até 23^o nucleotídeos) do ALS-M1 e aquela (1^o até 23^o nucleotídeos) do ALS-M2. Quando o conjunto de iniciadores do ALS-Rsp6 e do ALS-M2 foi utilizado, um fragmento de DNA descrito como o "PCR-6" na Figura 21 foi amplificado e quando o conjunto de iniciadores do ALS-M1 e do ALS-Rsp4 foi utilizado, um fragmento de
 10 DNA descrito como o "PCR-7" na Figura 21 foi amplificado.

A solução de reação foi preparada no momento da PCR através da dissolução de 1 µL de DNA polimerase LA Taq (5 unidades/µL, TAKARA), 10 µL do tampão LA 10 X, 10 µL de MgCl₂ 25 mM, 16 µL de dNTPs (que consistiam em 25 mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP, respectivamente), 1 µL de DNA molde e 4 µL de cada um dos iniciadores sentido e anti-sentido (25 pmoles/µL, respectivamente) em um volume total de 100 µL. A reação foi realizada através da repetição 25 vezes de um ciclo que consistia em uma etapa de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, uma etapa de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, uma etapa de anelamento a
 20 55°C durante 1 minuto e uma etapa de alongamento a 72°C durante 2 minutos e a etapa de alongamento no ciclo final foi realizada a 72°C durante 9 minutos.

Após a reação, a solução de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para a divisão proporcional, as bandas alvo de
 30 213 bp (PCR-6) e de 377 bp (PCR-7) foram cortadas e purificadas utilizando o GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit e então os fragmentos de DNA gerados dessa forma foram respectivamente eluídos com 100 µL de água

desionizada esterilizada.

Depois, a SPR foi realizada utilizando o PCR-6 e o PCR-7 obtidos dessa forma. No momento da SPR, foi preparada uma solução de reação em um volume final de 100 μ L através da mistura de 30 μ L do eluato
5 obtido dessa forma com 1 μ L de DNA polimerase LA Taq (5 unidades/ μ L), 10 μ L de tampão LA 10 X, 10 μ L de $MgCl_2$ 25 mM e 16 μ L de dNTPs (consistindo em 25 mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP, respectivamente). A SPR foi realizada através da repetição 40 vezes de um ciclo consistindo em uma etapa de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, uma etapa de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, uma etapa de anelamento a 55°C
10 durante 1 minuto e uma etapa de alongamento a 72°C durante 2 minutos e a etapa de alongamento no ciclo final foi realizada a 72°C durante 9 minutos.

Após a reação, a solução de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose (1,5%) para a divisão proporcional, uma banda alvo de
15 560 bp (descrita como "SPR-3" na Figura 21) foi cortada e purificada utilizando o GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit e então o fragmento de DNA gerado (SPR-3) foi eluído com 100 μ L de água desionizada esterilizada. De uma maneira similar à do método anterior, o fragmento eluído foi incorporado no vetor T pT7Blue e então transformada em *E. coli* (JM109). A *E.*
20 *coli* foi cultivada e então o plasmídeo extraído desta forma foi digerido com *Acc* I e *Sma* I, obtendo assim o fragmento de DNA mutante C514A (R172S) que possui o sítio *Sma* I e *Acc* I em seus terminais.

Enquanto isso, a *E. coli* (cepa JM109) transformada com pGEX-2T (ALS do tipo selvagem), o plasmídeo que possui o gene ALS do tipo selvagem incorporado no mesmo, foi cultivada sob agitação em meio LB líquido
25 contendo 50 ppm de ampicilina (2 mL x 15 meios) durante a noite a 37°C. Após o plasmídeo ter sido extraído utilizando um sistema de extração de plasmídeos (DP-480), o extrato (aproximadamente 750 μ L) foi concentrado em aproximadamente 200 μ L utilizando um concentrador por centrifugação a
30 vácuo. Então, o concentrado teve os sais extraídos utilizando o GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit e então o plasmídeo foi finalmente eluído com 200 μ L de água desionizada esterilizada.

Depois, o plasmídeo obtido dessa forma, pGEX-2T (ALS do tipo selvagem), foi digerido com *Acc I*. Especificamente, 75 µL do eluato foram misturados com 9 µL do tampão M 10 X, 3 µL de *Acc I* (12 u/µL) e 3 µL de água desionizada esterilizada e então foi permitido que a mistura reagisse a 37°C durante 3 horas. Após a reação, a solução de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para a divisão proporcional, a banda alvo foi cortada e coletada e então purificada utilizando o GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit e então um fragmento de DNA foi finalmente eluído com 100 µL de água desionizada esterilizada.

Subseqüentemente, o pGEX-2T (ALS do tipo selvagem) digerido com *Acc I* foi parcialmente digerido com *Sma I*. Especificamente, 79 µL do eluato foram misturados com 10 µL do tampão T 10 X, 10 µL de BSA 0,1% e 1 µL de *Sma I* (10 u/µL) em um volume final de 100 µL e então a mistura foi incubada a 30°C durante 1 minuto. Em adição, uma vez que o pGEX-2T (ALS do tipo selvagem) continha seqüências de reconhecimento de *Sma I* (no sítio de clonagem múltipla adjacente ao sítio de clivagem da Trombina do pGEX-2T, 276^a e 430^a seqüências do gene ALS) localizadas em três posições separadamente, foi realizada uma digestão parcial em um período curto. Após a reação, a solução de reação foi submetida à eletroforese em gel, uma banda correspondente ao plasmídeo em que a 430^a seqüência de reconhecimento de *Sma I* do gene ALS tinha sido digerida foi cortada e coletada e então purificada utilizando o GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit para remover enzimas e proteínas. Finalmente, o produto purificado foi eluído com 50 µL de água desionizada esterilizada. Este fragmento de cDNA do ALS do tipo selvagem no pGEX-2T digerido com *Acc I*/parcialmente digerido com *Sma I*, o fragmento de DNA mutante C512A(P171H) possuindo o sítio *Sma I* e o sítio *Acc I* em seus terminais obtido pelo método anterior e o fragmento de DNA mutante C514A(R172S) foram ligados através de um método padrão. Na Figura 22, um plasmídeo contendo um gene ALS mutante possuindo independentemente somente a mutação C512A(P171H) obtido através do método é descrito como "pGEX-2T(mutante P171H do ALS)" e um plasmídeo contendo um gene ALS mutante possuindo indepen-

dentemente somente a mutação C514A(R172S) é descrito como "pGEX-2T(mutante R172S do ALS)".

Depois disso, a *E. coli* (cepa JM 109) foi transformada utilizando um volume total da solução de reação. As colônias isoladas que apareceram no meio LB contendo ampicilina foram selecionadas através da PCR de uma maneira similar à do método anterior, de forma que a *E. coli* transformada com pGEX-2T(mutante P171H do ALS) e a *E. coli* transformada com pGEX-2T(mutante R172S do ALS) foram selecionadas.

[Exemplo 7] Síntese do cDNA do ALS com duas mutações pontuais (C512A (P171H)/C514A(R172S)), construção do pGEX-2T que mantém o cDNA do ALS e transformação de *E. coli* utilizando este vetor

A síntese do cDNA do ALS com 2 mutações pontuais (C512A (P171H)/C514A(R172S)) e a construção do pGEX-2T que mantém o cDNA do ALS são descritas utilizando a Figura 23.

O cDNA do ALS com 2 mutações pontuais (C512A(P171H)/C514A(R172S)) foi sintetizado através da PCR utilizando como um molde o DNA genômico extraído da linhagem Ga, de acordo com o método descrito no Exemplo 6 acima. Especificamente, a PCR foi realizada utilizando como um molde o DNA genômico extraído da linhagem Ga e um conjunto de iniciadores do ALS-Rsp6 e do ALS-Rsp4, amplificando assim um fragmento de DNA descrito como o "PCR-8" na Figura 23. Então, o fragmento de DNA amplificado foi ligado no vetor T pT7Blue, seguido pela digestão com *Acc* I e *Sma* I, obtendo assim o fragmento de DNA mutante C512A(P171H)/C514A (A172S). Depois, como mostrado na Figura 22, o fragmento de cDNA do ALS do tipo selvagem no pGEX-2T digerido com *Acc* I/digerido parcialmente com *Sma* I e o DNA mutante C512A(P171H)/C514A(R172S) foram ligados através de um método padrão. Assim, foi construído o pGEX-2T(mutante P171H, R172S do ALS). Ainda, de forma similar à do Exemplo 6, foi preparada a *E. coli* transformada com pGEX-2T(mutante P171H, R172S do ALS).

[Exemplo 8] Síntese do cDNA do ALS com 2 mutações pontuais (C512A (P171H)/G1643T(W548L) e C512A(P171H)/G1880T(S627I)), construção do pGEX-2T que mantém o cDNA do ALS e transformação de *E. coli* com este vetor

5 A síntese do cDNA do ALS com 2 mutações pontuais (C512A (P171H)/G1643T(W548L) e C512A(P171H)/G1880T(S627I)) e a construção do pGEX-2T que mantém o cDNA do ALS são descritas utilizando a Figura 24.

Primeiro, o pGEX 2T(mutante W548L do ALS) obtido no Exem-
 10 plo 5 foi digerido com *Acc* I e então parcialmente digerido com *Sma* I de acordo com o método do Exemplo 6, de forma a causar a deleção de uma parte partindo da 430ª sequência de reconhecimento do *Sma* I até a sequência de reconhecimento do *Acc* I do gene ALS. Depois, este produto e o fragmento do mutante C512A(P171H) preparado no Exemplo 6 foram liga-
 15 dos, de forma que um plasmídeo (descrito como pGEX-2T(mutante P171H, W548L do ALS) na Figura 24), contendo o cDNA do ALS com 2 mutações pontuais (C512A(P171H)/G1643T(W548L)) foi construído.

Enquanto isso, utilizando o pGEX 2T(mutante S627I do ALS) obtido no Exemplo 5, ao invés do pGEX 2T(mutante W548L do ALS), um
 20 plasmídeo (descrito como "pGEX-2T(mutante P171H, S627I do ALS)" na Figura 24) contendo o cDNA do ALS com 2 mutações pontuais (C512A (P171H)/G1880T(S627I)) foi construído similarmente.

Ainda, de uma maneira similar à do método do Exemplo 6, a *E. coli* foi transformada utilizando este pGEX-2T(mutante P171H, W548L do
 25 ALS) e o pGEX-2T(mutante P171H, S627I do ALS).

[Exemplo 9] Síntese do cDNA do ALS com 3 mutações pontuais (C512A (P171H)/G1643T(W548L)/G1880T(S627I)), construção do pGEX-2T que mantém o cDNA do ALS e transformação de *E. coli* com este vetor

A síntese do cDNA do ALS com 3 mutações pontuais (C512A
 30 (P171H)/G1643T(W548L)/G1880T(S627I)) e a construção do pGEX-2T que mantém este cDNA são descritas utilizando a Figura 25.

Primeiro, após o pGEX 2T(mutante S627I do ALS) obtido no

Exemplo 5 ter sido digerido com *Xho* I, o tratamento com BAP foi realizado de acordo com um método padrão. Depois, de acordo com o método anterior, um fragmento de gene alvo (no lado do vetor) foi separado e purificado do gel de agarose. Ainda, o pGEX 2T(mutante W548L do ALS) obtido no

5 Exemplo 5 foi digerido com *Xho* I e então um fragmento contendo a mutação foi separado e purificado do gel de agarose de acordo com o método anterior.

Depois, na construção "pGEX-2T (mutante W548L, S627I do ALS)" possuindo 2 mutações pontuais, G1880T(S627I) e G1643T(W548L),

10 os fragmentos de DNA obtidos foram respectivamente submetidos à reação de ligação. Após a reação, o volume total da solução de reação foi transformado em *E. coli* (cepa JM109). As colônias isoladas que apareceram no meio LB contendo ampicilina foram selecionadas através da PCR de acordo com o método anterior e então a *E. coli* possuindo um plasmídeo alvo

15 (pGEX-2T (mutante W548L, S627I do ALS)) foi selecionada.

Após o cultivo da *E. coli* selecionada, o pGEX-2T(mutante W548L, S627I do ALS) foi construído de acordo com o método anterior. O pGEX-2T (mutante W548L, S627I do ALS) foi digerido com *Acc* I e então parcialmente digerido com *Sma* I, construindo assim o pGEX-2T (mutante

20 W548L, S627I do ALS) em que uma parte partindo da 430ª sequência de reconhecimento do *Sma* I até a sequência de reconhecimento do *Acc* I no gene ALS foi deletada. Subseqüentemente, a ligação deste pGEX-2T e o fragmento mutante C512A(P171H) preparado no Exemplo 6 foi realizada, construindo assim um plasmídeo contendo o cDNA do ALS com 3 mutações

25 pontuais (C512A(P171H)/G1643T(W548L)/G1880T(S627I)) (descrito como "pGEX-2T(mutante P171H, W548L, S627I do ALS)" na Figura 25).

Ainda, a *E. coli* foi transformada utilizando o pGEX-2T(mutante P171H, W548L, S627I do ALS) de uma maneira similar à do método do Exemplo 6.

30 [Exemplo 10] Expressão da proteína ALS mutante

A *E. coli* transformada com o pGEX-2T(ALS do tipo selvagem) construído no Exemplo 3(5), a *E. coli* transformada com o pGEX-2T(mutante

W548L do ALS) construído no Exemplo 5, a *E. coli* transformada com o pGEX-2T(mutante S627I do ALS) construído no Exemplo 5, a *E. coli* transformada com o pGEX-2T(mutante P171H do ALS) construído no Exemplo 6, a *E. coli* transformada com o pGEX-2T(mutante R172S do ALS) construído no Exemplo 6, a *E. coli* transformada com o pGEX-2T(mutante P171H, R172S do ALS) construído no Exemplo 7, a *E. coli* transformada com o pGEX-2T(mutante P171H, W548L do ALS) construído no Exemplo 8, a *E. coli* transformada com o pGEX-2T(mutante P171H, S627I do ALS) construído no Exemplo 8 e a *E. coli* transformada com o pGEX-2T(mutante P171H, W548L, S627I do ALS) construído no Exemplo 9 foram respectivamente cultivadas sob agitação (pré-cultura) a 27°C em 2 ml de meio LB líquido contendo ampicilina. Estes tipos de *E. Coli* foram respectivamente cultivados em 250 mL de meio LB líquido contendo ampicilina utilizando 1 mL da solução da pré-cultura. Após o cultivo durante a noite, o IPTG 1 mM foi adicionado aos meios e então o cultivo foi realizado durante mais 3 até 4 horas, de forma que a expressão da proteína de fusão GST foi induzida. Em adição, as células foram armazenadas a -80°C após a lavagem.

A preparação e a purificação da ALS partindo de *E. coli* foram realizadas através do método a seguir. Primeiro, o pélete da *E. coli* transformante armazenada a -80°C foi suspensa no tampão de extração da ALS (tampão de fosfato de potássio (pH 7,5) contendo 30% de glicerol e 0,5 mM de $MgCl_2$). Especificamente, 2,5 mL do tampão foram adicionados ao pélete obtido de 50 mL da solução de cultura. A suspensão foi submetida ao tratamento com ultra-som (Heat Systems-Ultrasonics, Sonicator W-225R, microchip, controle de saída 8, intervalo de aproximadamente 1 segundo, duas vezes (40 segundos cada)) e submetida à centrifugação a 15000 x g, 4°C durante 20 minutos, obtendo assim o sobrenadante na forma de uma solução enzimática bruta.

Assim, 9 tipos de soluções enzimáticas brutas contendo qualquer uma da proteína de fusão da ALS do tipo selvagem com GST, da proteína de fusão da ALS mutante para W548L com GST, da proteína de fusão da ALS mutante para S627I com GST, da proteína de fusão da ALS mutante

para P171H com GST, da proteína de fusão da ALS mutante para R172S com GST, da proteína de fusão da ALS mutante para P171H/R172S com GST, da proteína de fusão da ALS mutante para P171H/W548L com GST, da proteína de fusão da ALS mutante para P171H/S627I com GST e da
5 proteína de fusão da ALS mutante para P171H/W548L/S627I com GST foram preparados.

[Exemplo 11] Sensibilidade aos herbicidas da proteína ALS mutante

A sensibilidade aos herbicidas da proteína ALS do tipo selvagem e a da proteína ALS mutante foram examinadas utilizando os 9 tipos de soluções enzimáticas brutas obtidos no Exemplo 10. O teste de sensibilidade
10 aos herbicidas foi realizado de acordo com os procedimentos quase iguais aqueles no Exemplo 2. Entretanto, neste exemplo, a temperatura de reação era de 37°C, o tempo de reação era de 30 minutos e foi adicionada valina 10 mM na solução de reação para inibir a atividade da ALS derivada de *E. coli*.
15 Ainda, três tipos de herbicidas, bispiribac-sódio, piritiobac-sódio e piriminobac, foram utilizados como herbicidas de PC; a clorossulfurona foi utilizada como um herbicida de sulfoniluréia; e a imazaquina foi utilizada como um herbicida de imidazolinona. Antes da adição da proteína ALS mutante, as soluções destes herbicidas (soluções aquosas de bispiribac-sódio e de piritiobac-sódio e soluções de acetona para os outros herbicidas) a uma certa
20 concentração foram adicionadas nas soluções de reação. A concentração final de acetona era de 1%.

Para os 9 tipos de soluções enzimáticas brutas, a atividade de inibição pelo bispiribac-sódio é mostrada nas Figuras 26 e 27 e na Tabela 9,
25 a atividade de inibição pelo piritiobac-sódio é mostrada na Tabela 10, a atividade de inibição pelo piriminobac é mostrada na Tabela 11, a atividade de inibição pela clorossulfurona é mostrada na Tabela 12 e a atividade de inibição pela imazaquina é mostrada na Tabela 13.

Nas Tabelas 9 até 13, a atividade de inibição por cada herbicida
30 é representada por uma concentração de herbicida (I50) que causa 50% de inibição, quando 50% de inibição é obtida em uma concentração testada e é representada pela % de inibição na concentração mais alta entre as concen-

- trações testadas, quando 50% de inibição não puder ser obtida. Ainda, nas Tabelas 9 até 13, a proporção de RS prevista refere-se à proporção de RS de uma proteína ALS mutante que possui várias mutações, que é uma proporção de RS combinada normalmente prevista partindo de cada proporção
- 5 de RS das proteínas ALS mutantes que possuem independentemente uma mutação. Ou seja, a proporção de RS prevista refere-se ao um efeito sinérgico normalmente previsto partindo de uma proporção combinada das proteínas ALS mutantes que possuem independentemente uma mutação. Especificamente, a proporção de RS prevista de uma proteína ALS mutante
- 10 que possui várias mutações foi calculada através da seleção das proporções de RS (para todas as mutações correspondendo às várias mutações desta proteína) de proteínas ALS mutantes que possuem respectivamente somente uma das mutações e então multiplicando as proporções de RS selecionadas. Quando uma proporção real de RS excede a proporção de RS
- 15 prevista de uma proteína ALS mutante que possui várias mutações, esta proteína possui resistência que excede o efeito sinérgico (resistência) previsto partindo de uma resistência combinada de proteínas ALS mutantes que possuem independentemente uma mutação.

Tabela 9

Tipo da proteína ALS	I50 (µM)	Proporção de RS	Proporção de RS prevista	Proporção de RS/proporção de RS prevista
Tipo selvagem	0,0063			
Mutante P171H	0,055	8,7		
Mutante R172S	0,0062	0,98		
Mutante W548L	3,3	520		
Mutante S627I	0,26	41		
Mutante P171H/R172S	0,048	7,6	8,5	0,89
Mutante P171H/W548L	5,5% em 100 µM	>15000	4500	>3,3
Mutante P171H/S627I	23	3700	360	10
Mutante P171H/W548L/S627I	1,1% em 100 µM	>16000	190000	>0,084

Tabela 10

Tipo da proteína ALS	ISO (µM)	Proporção de RS	Proporção de RS prevista	Proporção de RS/proporção de RS prevista
Tipo selvagem	0,011			
Mutante P171H	0,037	3,4		
Mutante R172S	0,011	1		
Mutante W548L	41% em 100 µM	>9100		
Mutante S627I	2,2	200		
Mutante P171H/R172S	0,14	13	3,4	3,8
Mutante P171H/W548L	20% em 100 µM	>9100	>31000	
Mutante P171H/S627I	9,4	850	680	1,3

Tabela 11

Tipo da proteína ALS	I50 (µM)	Proporção de RS	Proporção de RS prevista	Proporção de RS/proporção de RS prevista
Tipo selvagem	0,008			
Mutante P171H	0,04	5		
Mutante R172S	0,0092	1,2		
Mutante W548L	36	4500		
Mutante S627I	22	2800		
Mutante P171H/R172S	0,041	5,1	6	0,85
Mutante P171H/W548L	11% em 100 µM	>13000	23000	>0,57
Mutante P171H/S627I	21% em 100 µM	>13000	14000	>0,93

Tabela 12

Tipo da proteína ALS	150 (µM)	Proporção de RS	Proporção de RS prevista	Proporção de RS/proporção de RS prevista
Tipo selvagem	0,013			
Mutante P171H	1,1	85		
Mutante R172S	0,011	0,85		
Mutante W548L	9,9	760		
Mutante S627I	0,031	2,4		
Mutante P171H/R172S	5,5	420	72	5,8
Mutante P171H/W548L	16% em 100 µM	>7700	65000	>0,18
Mutante P171H/S627I	9,9	760	200	3,8
Mutante P171H/W548L/S627I	30% em 500 µM	>38000	160000	>0,24

Tabela 13

Tipo da proteína ALS	150 (µM)	Proporção de RS	Proporção de RS prevista	Proporção de RS/proporção de RS prevista
Tipo selvagem	2,2			
Mutante P171H	3,4	1,5		
Mutante R172S	2,3	1		
Mutante W548L	16% em 100 µM	>45		
Mutante S627I	15	6,8		
Mutante P171H/R172S	3,9	1,8	1,5	1,2
Mutante P171H/W548L	13% em 100 µM	>45	>68	
Mutante P171H/S627I	71	32	10	3,2
Mutante P171H/W548L/S627I	15% em 100 µM	>45	>460	

Os dados das Tabelas 9 até 13 acima são descritos abaixo em ordem.

Primeiro, os dados da atividade de inibição pelo bispiribac-sódio (Tabela 9) revelaram o seguinte:

5 Entre a proteína ALS mutante codificada pelos genes com 1
mutação pontual (P171H, R172S, W548L e S627I), a proteína ALS mutante
W548L exibiu a resistência maior ao bispiribac-sódio (proporção de RS:
520). A proteína ALS mutante S627I ou a proteína ALS mutante P171H exi-
bia ainda alta resistência (proporção de RS: 41 e 8,7, respectivamente), mas
10 a proteína ALS mutante R172S exibia resistência apenas equivalente àquela
da proteína ALS do tipo selvagem (proporção de RS: 0,98). Estes resultados
revelaram que a mutação P171H, mutação W548L e a mutação S627I na
proteína ALS são mutações eficientes no aumento da resistência ao bispiri-
bac-sódio. Ainda, foi mostrado que a mutação R172S na proteína ALS era
15 uma mutação silenciosa.

Por outro lado, entre as proteínas ALS mutantes codificadas pe-
los genes com 2 mutações pontuais, a proteína ALS mutante P171H/W548L
exibia a maior resistência ao bispiribac-sódio (5,5% de inibição em 100 µM
e proporção de RS: >15000). A proteína ALS mutante P171H/S627I também
20 exibia grande resistência ao bispiribac-sódio (proporção de RS: 3700). O
grau de resistência da proteína ALS mutante P171H/R172S era aproxima-
damente a mesma que a da proteína ALS mutante P171H. Ainda, a proteína
ALS mutante P171H/W548L/S627I codificada pelo gene com 3 mutações
pontuais também conferia alta resistência ao bispiribac-sódio (1,1% de inibi-
25 ção quando 100 µM e proporção RS: >16000). Em adição, os resultados re-
ais de resposta à dose de herbicida sobre os quais estes resultados eram
baseados são mostrados nas Figuras 26 e 27.

Para as mutações em 2 pontos e em 3 pontos, as proporções de
RS previstas e as proporções de RS reais foram comparadas. As proporções
30 de RS da proteína ALS mutante P171H/W548L e da proteína ALS mutante
P171H/S627I eram significativamente maiores que as proporções RS pre-
vistas (a proporção de RS em relação à proporção de RS prevista era nota-

velmente maior que 1). Estes resultados revelaram que estes dois genes com 2 mutações pontuais (o gene que codifica a proteína ALS mutante P171H/W548L e o gene que codifica a proteína ALS mutante P171H/S627I) conferem uma resistência contra o bispiribac-sódio à proteína ALS que é maior que um efeito aditivo previsto partindo do grau de cada resistência do gene com 1 mutação pontual.

Depois, a atividade de inibição pelo piritiobac-sódio (Tabela 10) revelou o seguinte:

Entre as proteínas ALS mutantes (P171H, R172S, W548L e S627I) codificadas pelos genes com 1 mutação pontual, a proteína ALS mutante W548L exibiu a maior resistência ao piritiobac-sódio (41% em 100 μ M e proporção de RS: >9100). A proteína ALS mutante S627I também exibiu resistência (proporção de RS: 200), mas o grau de resistência da proteína ALS mutante P171H era baixo (proporção de RS: 3,4). A proteína ALS mutante R172S exibiu resistência apenas equivalente àquela da proteína ALS do tipo selvagem (proporção RS: 0,85). Estes resultados revelaram que a mutação P171H, a mutação W548L e a mutação S627I nas proteínas ALS são mutações eficientes no aumento da resistência ao piritiobac-sódio. Ainda, foi mostrado que a mutação R172S na proteína ALS era uma mutação silenciosa.

Por outro lado, entre as proteínas ALS mutantes codificadas pelos genes com 2 mutações pontuais, a proteína ALS mutante P171H/W548L conferia a maior resistência (20% de inibição em 100 μ M e proporção de RS: >9100), seguida pela proteína ALS mutante P171H/S627I (proporção de RS: 850). Ao contrário dos dados da atividade inibidora do bispiribac-sódio mostrados na Tabela 9, no caso do piritiobac-sódio, a proteína ALS mutante P171H/R172S exibiu um grau de resistência maior que o da proteína ALS mutante P171H (proporção de RS: 13). Assim, foi esclarecido que a mutação R172S, que é por si só uma mutação silenciosa, aumenta o grau de resistência da proteína ALS mutante P171H.

Ainda, para as proteínas ALS com 2 mutações pontuais, quando uma proporção de RS prevista combinada proveniente de cada proporção de

RS de proteínas ALS com 1 mutação pontual e a proporção de RS real foram comparadas, foi descoberto que a proporção de RS da proteína ALS mutante P171H/R172S era significativamente maior que aquela da proporção de RS prevista (a proporção da proporção de RS real em relação à proporção de RS prevista era notavelmente maior que 1). Estes resultados revelaram que a proteína ALS mutante P171H/R172S exibia uma resistência ao piritiobac-sódio maior que a prevista partindo dos graus de resistência dos genes com 1 mutação pontual.

Depois, a atividade de inibição pelo piriminobac (Tabela 11) revelou o seguinte:

Entre as proteínas ALS mutantes codificadas pelos genes com 1 mutação pontual (P171H, R172S, W548L e S627I), a proteína ALS mutante W548L exibiu a maior resistência ao piriminobac (proporção de RS: 4500). A proteína ALS mutante S627I também conferiu alta resistência (proporção de RS: 2800), mas o grau de resistência da proteína ALS mutante P171H era baixo (proporção de RS: 5). A proteína ALS mutante R172S exibiu resistência apenas equivalente àquela da proteína ALS do tipo selvagem (proporção de RS: 1,2). Estes resultados revelaram que a mutação P171H, a mutação W548L e a mutação S627I nas proteínas ALS são mutações eficientes no aumento da resistência ao piriminobac. Ainda, foi mostrado que a mutação R172S na proteína ALS era uma mutação silenciosa.

Entre as proteínas ALS mutantes codificadas pelos genes com 2 mutações pontuais, a proteína ALS mutante P171H/W548L conferia a maior resistência (11% de inibição em 100 μ M e proporção de RS: >13000), seguida pela proteína ALS mutante P171H/S627I (21% de inibição quando 100 μ M e proporção de RS: >13000). Para estas proteínas ALS mutantes P171H/W548L e ALS mutante P171H/S627I, as proporções de RS previstas e as proporções de RS reais foram comparadas. Entretanto, não podia ser esclarecido se era mostrada uma resistência maior que a resistência prevista partindo dos graus de resistências de cada gene com 1 mutação pontual.

Depois, a atividade de inibição pela clorossulfurona (Tabela 12) revelou o seguinte:

Entre as proteínas ALS mutantes codificadas pelos genes com 1 mutação pontual (P171H, R172S, W548L e S627I), a proteína ALS mutante
 5 W548L exibiu a maior resistência à clorossulfurona (proporção de RS: 520). A proteína ALS mutante P171H exibiu uma resistência relativamente alta (proporção de RS: 85), mas o grau de resistência da proteína ALS mutante S627I era baixo (proporção de RS ratio: 2,4). A proteína ALS mutante R172S
 10 exibiu resistência apenas equivalente àquela da proteína ALS do tipo selvagem (proporção de RS: 0,85). Estes resultados revelaram que a mutação P171H e a mutação W548L na proteína ALS são mutações eficientes no aumento da resistência à clorossulfurona. Ainda, foi mostrado que a mutação R172S na proteína ALS era uma mutação silenciosa.

Entre as proteínas ALS mutantes codificadas pelos genes com 2
 15 mutações pontuais, a proteína ALS mutante P171H/W548L conferia a maior resistência (16% de inibição em 100 μ M e proporção de RS: >7700), seguida pela proteína ALS mutante P171H/S627I (proporção de RS: 760). Ao contrário dos dados de atividade de inibição pelo bispiribac-sódio mostrados na Tabela 9, no caso da clorossulfurona, a proteína ALS mutante P171H/R172S
 20 exibiu um grau de resistência (proporção de RS: 420) maior que o da proteína ALS mutante P171H. Assim, foi esclarecido que a mutação R172S, que é por si só uma mutação silenciosa, aumenta o grau de resistência da proteína ALS mutante P171H. Ainda, a proteína ALS mutante P171H/W548L/S627I também conferiu uma resistência alta (30% de inibição em 500 μ M e proporção de RS: >3800).
 25

Para as proteínas ALS mutante P171H/R172S e ALS mutante P171H/S627I, as proporções de RS previstas e as proporções de RS reais foram comparadas. Para ambas as proteínas, as proporções de RS reais eram significativamente maiores que as proporções de RS previstas. Estes
 30 resultados revelaram que a proteína ALS mutante P171H/R172S e a proteína ALS mutante P171H/S627I exibiam uma resistência à clorossulfurona maior que aquela prevista partindo dos graus de resistência de cada gene

com 1 mutação pontual.

Depois, os dados da atividade inibidora pela Imazaquina (Tabela 13) revelaram o seguinte:

Entre as proteínas ALS mutantes codificadas pelos genes mutantes com 1 mutação pontual (P171H, R172S, W548L e S627I), a proteína ALS mutante W548L exibiu a maior resistência à imazaquina (14% em 100 μ M e proporção de RS: >45). A proteína ALS mutante S627I também exibiu resistência (proporção de RS: 41), mas a proteína ALS mutante P171H exibiu quase nenhuma resistência (proporção de RS: 1,5). A proteína ALS mutante R172S exibiu resistência somente equivalente àquela da proteína ALS do tipo selvagem (proporção de RS: 0,98). Estes resultados revelaram que a mutação W548L e a mutação S627I na proteína ALS são mutações eficientes no aumento da resistência à imazaquina. Ainda, foi mostrado que a mutação P171H e a mutação R172S na proteína ALS eram silenciosas contra a imazaquina.

Entre os genes com 2 mutações pontuais, a proteína ALS mutante P171H/W548L conferiu a maior resistência (13% de inibição em 100 μ M e proporção de RS: >45), seguida pela proteína ALS mutante P171H/S627I (proporção de RS: 32). O grau de resistência da proteína ALS mutante P171H/R172S era quase o mesmo que o do gene com 1 mutação pontual p171H. Ainda, a proteína ALS mutante P171H/W548L/S627I também conferiu alta resistência (15% de inibição em 100 μ M e proporção de RS: >45).

Para estas proteínas ALS com 2 mutações pontuais e para a proteína ALS com 3 mutações pontuais, as proporções de RS previstas e as proporções de RS reais foram comparadas. A proporção de RS da proteína ALS mutante P171H/S627I era significativa maior que a proporção de RS prevista (a proporção da proporção de RS real em relação à proporção de RS prevista era claramente maior que 1). Estes resultados revelaram que a proteína ALS mutante P171H/S627I exibiu uma resistência à imazaquina maior que a prevista partindo dos graus de resistências de cada gene com 1 mutação pontual.

Aplicabilidade Industrial

Como descrito em detalhes acima, a presente invenção pode fornecer um gene que codifica a acetolactato sintase que exibe boa resistência a vários herbicidas, uma proteína acetolactato sintase codificada pelo gene, um vetor recombinante que possui o gene, um transformante que possui o vetor recombinante, uma planta que possui o gene, um método para o cultivo da planta e um método para a seleção de uma célula transformada utilizando o gene como um marcador de seleção.

Texto sem Listagem de Sequências

10 As SEQ ID N^{os}: 9 até 34 representam iniciadores.

O 15^o n na SEQ ID N^o: 39 representa a, c, g ou t.

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que consiste em uma sequência de nucleotídeos como definida em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 3, 5 e 7.
- 5 2. Proteína, caracterizada pelo fato de que consiste em uma sequência de aminoácido como definida em qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 4, 6 e 8.
3. Vetor recombinante, caracterizado pelo fato de que apresenta o ácido nucleico como definido na reivindicação 1.
- 10 4. Bactéria, caracterizada pelo fato de que apresenta o vetor recombinante como definido na reivindicação 3.
5. Processo para cultivar uma planta que apresenta o ácido nucleico como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo da planta na presença de pelo menos um ou mais herbicidas selecionados do grupo que consiste em um herbicida de bispiribac sódio, um herbicida de piritiobac sódio e um herbicida de piriminobac.
- 15 6. Processo para cultivar uma planta que apresenta a proteína como definida na reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo da planta na presença de pelo menos um ou mais herbicidas selecionados do grupo que consiste em um herbicida de bispiribac sódio, um herbicida de piritiobac- sódio e um herbicida de piriminobac.
- 20 7. Processo para a seleção de uma célula transformante que apresenta o ácido nucleico como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que utiliza o ácido nucleico como um marcador de seleção.
- 25 8. Processo para selecionar uma célula transformante apresentando a proteína como definida na reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que usa o ácido nucleico como um marcador de seleção.

Fig. 1 A

Selvagem	1	MATTAATAAALSAATAKTGRKNHQRHHVL PARGRVGAAGVRCASVSPVTPSPAPPAT	60
Mutante P/R	1	MATTAATAAALSAATAKTGRKNHQRHHVL PARGRVGAAGVRCASVSPVTPSPAPPAT	60
Mutante P/W	1	MATTAATAAALSAATAKTGRKNHQRHHVL PARGRVGAAGVRCASVSPVTPSPAPPAT	60
Mutante P/S	1	MATTAATAAALSAATAKTGRKNHQRHHVL PARGRVGAAGVRCASVSPVTPSPAPPAT	60
Mutante P/S/W	1	MATTAATAAALSAATAKTGRKNHQRHHVL PARGRVGAAGVRCASVSPVTPSPAPPAT	60

Selvagem	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCQVSDVFAYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG	120
Mutante P/R	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCQVSDVFAYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG	120
Mutante P/W	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCQVSDVFAYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG	120
Mutante P/S	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCQVSDVFAYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG	120
Mutante P/S/W	61	PLRPWGPAEPRKGADILVEALERCQVSDVFAYPGGASMEI HQALTRSPVI TNHLFRHEQG	120

Selvagem	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGOVPRRMIGTDAF	180
Mutante P/R	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGOVPRRMIGTDAF	180
Mutante P/W	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGOVPRRMIGTDAF	180
Mutante P/S	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGOVPRRMIGTDAF	180
Mutante P/S/W	121	EAFASGYARASGRVGVCVATSGPGATNLVSALADALLDSVPMVAITGOVPRRMIGTDAF	180

Selvagem	181	QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQNAVVPV	240
Mutante P/R	181	QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQNAVVPV	240
Mutante P/W	181	QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQNAVVPV	240
Mutante P/S	181	QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQNAVVPV	240
Mutante P/S/W	181	QETPIVEVTRSITKHNYLVLDVEDIPRVIQEAFFLASSGRPGPVLVDIPKDIQQQNAVVPV	240

Selvagem	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVFLGTGI	300
Mutante P/R	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVFLGTGI	300
Mutante P/W	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVFLGTGI	300
Mutante P/S	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVFLGTGI	300
Mutante P/S/W	241	WDTSMNLPGYIARLPKPPATELLEQVRLVGESRRPILYVGGGCSASGDELRFVFLGTGI	300

Selvagem	301	PVTTTLMGLGNFSDPLSLRMLGMHGTYYANYAVDKADLLAFGVRFDORVTGKIEAFA	360
Mutante P/R	301	PVTTTLMGLGNFSDPLSLRMLGMHGTYYANYAVDKADLLAFGVRFDORVTGKIEAFA	360
Mutante P/W	301	PVTTTLMGLGNFSDPLSLRMLGMHGTYYANYAVDKADLLAFGVRFDORVTGKIEAFA	360
Mutante P/S	301	PVTTTLMGLGNFSDPLSLRMLGMHGTYYANYAVDKADLLAFGVRFDORVTGKIEAFA	360
Mutante P/S/W	301	PVTTTLMGLGNFSDPLSLRMLGMHGTYYANYAVDKADLLAFGVRFDORVTGKIEAFA	360

Selvagem	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCADVKLALQGLNALLQGSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
Mutante P/R	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCADVKLALQGLNALLQGSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
Mutante P/W	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCADVKLALQGLNALLQGSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
Mutante P/S	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCADVKLALQGLNALLQGSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420
Mutante P/S/W	361	SRAKIVHIDIDPAEIGKNKQPHVSCADVKLALQGLNALLQGSTTKTSSDFSAAWHNELDQ	420

Selvagem	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPOYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHOMMAAQYTYKRPQWLS	480
Mutante P/R	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPOYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHOMMAAQYTYKRPQWLS	480
Mutante P/W	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPOYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHOMMAAQYTYKRPQWLS	480
Mutante P/S	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPOYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHOMMAAQYTYKRPQWLS	480
Mutante P/S/W	421	QKREFPLGYKTFGEEIPPOYAIQVLDLTKGEAIATGVGQHOMMAAQYTYKRPQWLS	480

Selvagem	481	SAGLGAMGFLPAAAGASYANPGVTVDIDGDSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVNLNQ	540
Mutante P/R	481	SAGLGAMGFLPAAAGASYANPGVTVDIDGDSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVNLNQ	540
Mutante P/W	481	SAGLGAMGFLPAAAGASYANPGVTVDIDGDSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVNLNQ	540

Fig. 1 B

Mutante P/S	481	SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNO	540
Mutante P/S/W	481	SAGLGAMGFGLPAAAGASVANPGVTVDIDGGSFLMNIQELALIRIENLPVKVMVLNNO	540

Selvagem	541	H LGMVVQWEDRFYKANRAHTYLG NPECESE I YPDFVT I AKGFNI PAVRVTKKSEVRAA I K	600
Mutante P/R	541	H LGMVVQWEDRFYKANRAHTYLG NPECESE I YPDFVT I AKGFNI PAVRVTKKSEVRAA I K	600
Mutante P/W	541	H LGMVVQLED RFYKANRAHTYLG NPECESE I YPDFVT I AKGFNI PAVRVTKKSEVRAA I K	600
Mutante P/S	541	H LGMVVQWEDRFYKANRAHTYLG NPECESE I YPDFVT I AKGFNI PAVRVTKKSEVRAA I K	600
Mutante P/S/W	541	H LGMVVQLED RFYKANRAHTYLG NPECESE I YPDFVT I AKGFNI PAVRVTKKSEVRAA I K	600

Selvagem	601	K MLETPGPYLLD I I VPHQEHVLP M I P SGGAFKDM I LDGDGRTVY	644
Mutante P/R	601	K MLETPGPYLLD I I VPHQEHVLP M I P SGGAFKDM I LDGDGRTVY	644
Mutante P/W	601	K MLETPGPYLLD I I VPHQEHVLP M I P SGGAFKDM I LDGDGRTVY	644
Mutante P/S	601	K MLETPGPYLLD I I VPHQEHVLP M I P SGGAFKDM I LDGDGRTVY	644
Mutante P/S/W	601	K MLETPGPYLLD I I VPHQEHVLP M I P SGGAFKDM I LDGDGRTVY	644

Fig. 2 A

[illegible]

Fig. 2 B

Mutante P/S	601	TAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAGCACAATTACCTTGTCTTGTATGTGGAGGACA	660
Mutante P/W/S	601	TAGTCGAGGTCACCCGCTCCATCACCAGCACAATTACCTTGTCTTGTATGTGGAGGACA	660

Selvagem	661	TCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTTGGCCGGTGC	720
Mutante P/R	661	TCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTTGGCCGGTGC	720
Mutante P/W	661	TCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTTGGCCGGTGC	720
Mutante P/S	661	TCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTTGGCCGGTGC	720
Mutante P/W/S	661	TCCCCCGGTCATACAGGAAGCCTTCTTCTCGCGTCCTCGGGCCGTCTTGGCCGGTGC	720

Selvagem	721	TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCGGTGCCGGTGTGGGACACGTGGA	780
Mutante P/R	721	TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCGGTGCCGGTGTGGGACACGTGGA	780
Mutante P/W	721	TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCGGTGCCGGTGTGGGACACGTGGA	780
Mutante P/S	721	TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCGGTGCCGGTGTGGGACACGTGGA	780
Mutante P/W/S	721	TGGTCGACATCCCCAAGGACATCCAGCAGCAGATGGCGGTGCCGGTGTGGGACACGTGGA	780

Selvagem	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGGCCACCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840
Mutante P/R	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGGCCACCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840
Mutante P/W	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGGCCACCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840
Mutante P/S	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGGCCACCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840
Mutante P/W/S	781	TGAATCTACAGGGTACATCGCAGCCTGCCAAGGCCACCGCGACAGAATTGCTTGAGC	840

Selvagem	841	AGGTCTTGCCTGTGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTGGTGGTGGCTGCT	900
Mutante P/R	841	AGGTCTTGCCTGTGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTGGTGGTGGCTGCT	900
Mutante P/W	841	AGGTCTTGCCTGTGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTGGTGGTGGCTGCT	900
Mutante P/S	841	AGGTCTTGCCTGTGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTGGTGGTGGCTGCT	900
Mutante P/W/S	841	AGGTCTTGCCTGTGTTGGCGAGTCACGGCGCCGATTCTCTATGTGGTGGTGGCTGCT	900

Selvagem	901	CTGCATCTGGTGACAAATTGGCGTGGTTTGTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960
Mutante P/R	901	CTGCATCTGGTGACAAATTGGCGTGGTTTGTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960
Mutante P/W	901	CTGCATCTGGTGACAAATTGGCGTGGTTTGTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960
Mutante P/S	901	CTGCATCTGGTGACAAATTGGCGTGGTTTGTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960
Mutante P/W/S	901	CTGCATCTGGTGACAAATTGGCGTGGTTTGTGAGCTGACTGGTATCCAGTTACAACCA	960

Selvagem	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTACGACCCGTTGTCCCTGCACATGCTTGGGA	1020
Mutante P/R	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTACGACCCGTTGTCCCTGCACATGCTTGGGA	1020
Mutante P/W	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTACGACCCGTTGTCCCTGCACATGCTTGGGA	1020
Mutante P/S	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTACGACCCGTTGTCCCTGCACATGCTTGGGA	1020
Mutante P/W/S	961	CTCTGATGGGCTCGGCAATTTCCCAAGTACGACCCGTTGTCCCTGCACATGCTTGGGA	1020

Selvagem	1021	TGCATGGCAGGTTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCSTTTG	1080
Mutante P/R	1021	TGCATGGCAGGTTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCSTTTG	1080
Mutante P/W	1021	TGCATGGCAGGTTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCSTTTG	1080
Mutante P/S	1021	TGCATGGCAGGTTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCSTTTG	1080
Mutante P/W/S	1021	TGCATGGCAGGTTACGCAAAATTATGCCGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGCSTTTG	1080

Selvagem	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGCAAGCAGGCAAGA	1140
Mutante P/R	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGCAAGCAGGCAAGA	1140
Mutante P/W	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGCAAGCAGGCAAGA	1140
Mutante P/S	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGCAAGCAGGCAAGA	1140
Mutante P/W/S	1081	GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGGAATTTGAGGCTTTTGCAAGCAGGCAAGA	1140

Selvagem	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGAAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200
Mutante P/R	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGAAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200
Mutante P/W	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGAAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200
Mutante P/S	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGAAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200
Mutante P/W/S	1141	TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGAAAGAAACAAGCAACCACATGTGTCAA	1200

Selvagem	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTGTCTGCTACAACAGAGCACA	1260
Mutante P/R	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTGTCTGCTACAACAGAGCACA	1260
Mutante P/W	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTGTCTGCTACAACAGAGCACA	1260
Mutante P/S	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTGTCTGCTACAACAGAGCACA	1260
Mutante P/W/S	1201	TTTGGCGAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTGTCTGCTACAACAGAGCACA	1260

Selvagem	1261	CAAAGACAAGTTCTGATTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAGAGGGAGT	1320
Mutante P/R	1261	CAAAGACAAGTTCTGATTTAGTGCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAGAGGGAGT	1320

Fig. 2 C

Mutante P/W	1261	CAAGACAAGTTCTGATTTTATGTCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT	1320
Mutante P/S	1261	CAAGACAAGTTCTGATTTTATGTCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT	1320
Mutante P/W/S	1261	CAAGACAAGTTCTGATTTTATGTCATGGCACAATGAGTTGGACCAGCAGAAGAGGGAGT	1320

Selvagem	1321	TTCCCTCTGGGTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTACAGGTGC	1380
Mutante P/R	1321	TTCCCTCTGGGTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTACAGGTGC	1380
Mutante P/W	1321	TTCCCTCTGGGTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTACAGGTGC	1380
Mutante P/S	1321	TTCCCTCTGGGTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTACAGGTGC	1380
Mutante P/W/S	1321	TTCCCTCTGGGTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTACAGGTGC	1380

Selvagem	1381	TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGT	1440
Mutante P/R	1381	TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGT	1440
Mutante P/W	1381	TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGT	1440
Mutante P/S	1381	TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGT	1440
Mutante P/W/S	1381	TGGATGAGCTGACGAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGGGCAGCACCAGATGT	1440

Selvagem	1441	GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTCGGCTGGTCTGG	1500
Mutante P/R	1441	GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTCGGCTGGTCTGG	1500
Mutante P/W	1441	GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTCGGCTGGTCTGG	1500
Mutante P/S	1441	GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTCGGCTGGTCTGG	1500
Mutante P/W/S	1441	GGGCGGCACAATATTACACCTACAAGCGGCCACGGCAGTGGCTGTCTCGGCTGGTCTGG	1500

Selvagem	1501	GGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGCAAGTGGTGGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA	1560
Mutante P/R	1501	GGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGCAAGTGGTGGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA	1560
Mutante P/W	1501	GGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGCAAGTGGTGGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA	1560
Mutante P/S	1501	GGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGCAAGTGGTGGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA	1560
Mutante P/W/S	1501	GGCAATGGGATTTGGGCTGGCTGCTGCAAGTGGTGGCTTCTGTGGCTAACCCAGGTGTCA	1560

Selvagem	1561	CAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTAGCTTCTCATGAACATTACAGAGCTGGCATTGA	1620
Mutante P/R	1561	CAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTAGCTTCTCATGAACATTACAGAGCTGGCATTGA	1620
Mutante P/W	1561	CAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTAGCTTCTCATGAACATTACAGAGCTGGCATTGA	1620
Mutante P/S	1561	CAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTAGCTTCTCATGAACATTACAGAGCTGGCATTGA	1620
Mutante P/W/S	1561	CAGTTGTTGATTTGATGGGATGGTAGCTTCTCATGAACATTACAGAGCTGGCATTGA	1620

Selvagem	1621	TCCGCATTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTGGGATATGG	1680
Mutante P/R	1621	TCCGCATTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTGGGATATGG	1680
Mutante P/W	1621	TCCGCATTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTGGGATATGG	1680
Mutante P/S	1621	TCCGCATTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTGGGATATGG	1680
Mutante P/W/S	1621	TCCGCATTGAGAACCCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTGGGATATGG	1680

Selvagem	1681	TGGTGAATGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACC	1740
Mutante P/R	1681	TGGTGAATGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACC	1740
Mutante P/W	1681	TGGTGAATGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACC	1740
Mutante P/S	1681	TGGTGAATGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACC	1740
Mutante P/W/S	1681	TGGTGAATGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACC	1740

Selvagem	1741	CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC	1800
Mutante P/R	1741	CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC	1800
Mutante P/W	1741	CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC	1800
Mutante P/S	1741	CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC	1800
Mutante P/W/S	1741	CGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC	1800

Selvagem	1801	CTGCAGTCCGTGTAAACAAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA	1860
Mutante P/R	1801	CTGCAGTCCGTGTAAACAAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA	1860
Mutante P/W	1801	CTGCAGTCCGTGTAAACAAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA	1860
Mutante P/S	1801	CTGCAGTCCGTGTAAACAAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA	1860
Mutante P/W/S	1801	CTGCAGTCCGTGTAAACAAAGAGAGTGAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCGAGA	1860

Selvagem	1861	CTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA	1920
Mutante P/R	1861	CTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA	1920
Mutante P/W	1861	CTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA	1920
Mutante P/S	1861	CTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA	1920
Mutante P/W/S	1861	CTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTATGA	1920

Wild	1921	TCCCAAGTGGGGCGCATTCAAGGACATGATCTGGATGGTATGGCAGGAGTGTGTATT	1980

Fig. 2 D

Mutante P/R	1921	TCCCAAGTGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTATGGCAGGACTGTGTATT	1980
Mutante P/W	1921	TCCCAAGTGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTATGGCAGGACTGTGTATT	1980
Mutante P/S	1921	TCCCAATTGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTATGGCAGGACTGTGTATT	1980
Mutante P/W/S	1921	TCCCAATTGGGGCGCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTATGGCAGGACTGTGTATT	1980

Selvagem	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
Mutante P/R	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
Mutante P/W	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
Mutante P/S	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040
Mutante P/W/S	1981	AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGACCC	2040

Selvagem	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
Mutante P/R	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
Mutante P/W	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
Mutante P/S	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100
Mutante P/W/S	2041	ATAAAGAGTGGTATGCCTATGATGTTTGTATGTGCTCTATCAATAACTAAGGTGTCAACT	2100

Selvagem	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
Mutante P/R	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
Mutante P/W	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
Mutante P/S	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160
Mutante P/W/S	2101	ATGAACCATATGCTCTTCTGTTTACTTGTGATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA	2160

Selvagem	2161	GCTTCCTGCTGTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
Mutante P/R	2161	GCTTCCTGCTGTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
Mutante P/W	2161	GCTTCCTGCTGTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
Mutante P/S	2161	GCTTCCTGCTGTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220
Mutante P/W/S	2161	GCTTCCTGCTGTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA	2220

Selvagem	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA	2280
Mutante P/R	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA	2280
Mutante P/W	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA	2280
Mutante P/S	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAAAGAGAATAAAGTACTTCTATGTA AAA	2280
Mutante P/W/S	2221	TCATGTAAGTTTCTTGTCTACATATCAATAAAGAGAATAAAGTACTTCTATGTA AAA	2280

Selvagem	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2301
Mutante P/R	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2301
Mutante P/W	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2300
Mutante P/S	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2294
Mutante P/W/S	2281	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	2294

Fig.3

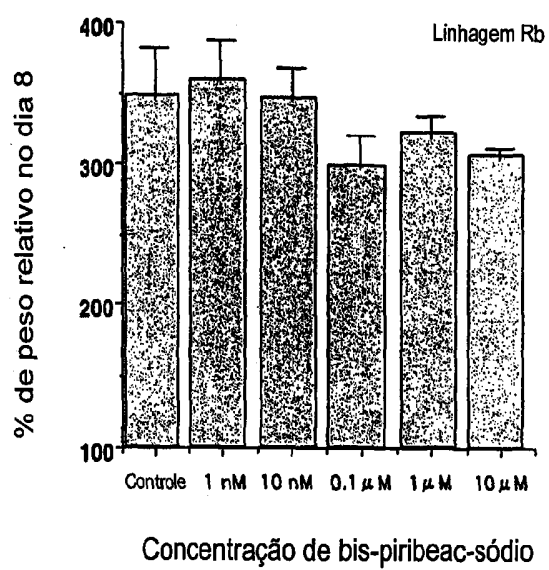


Fig. 4

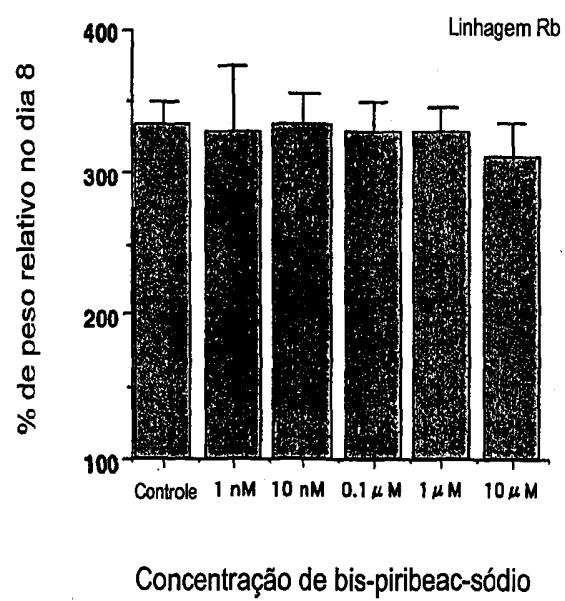


Fig. 5

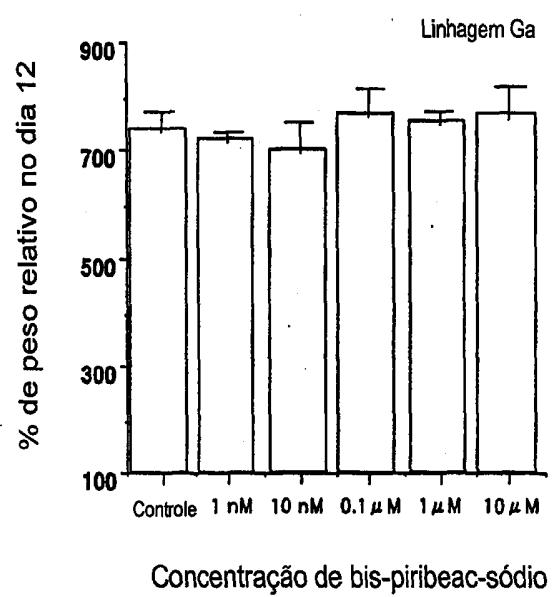


Fig. 6

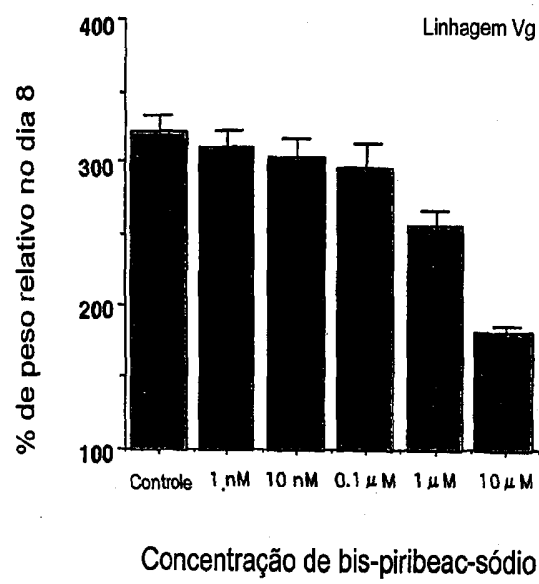


Fig. 7

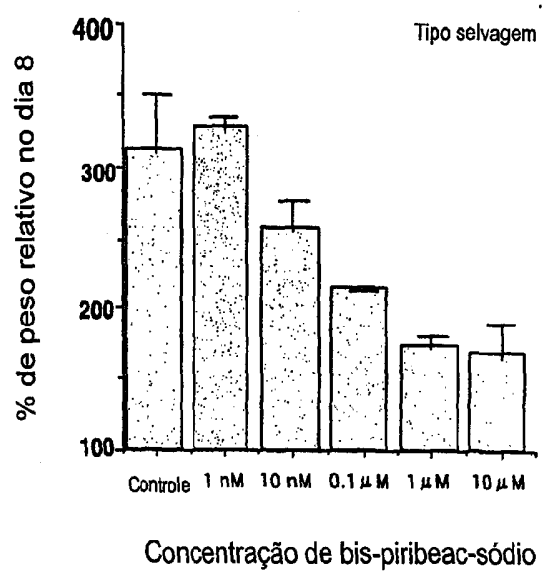


Fig. 8

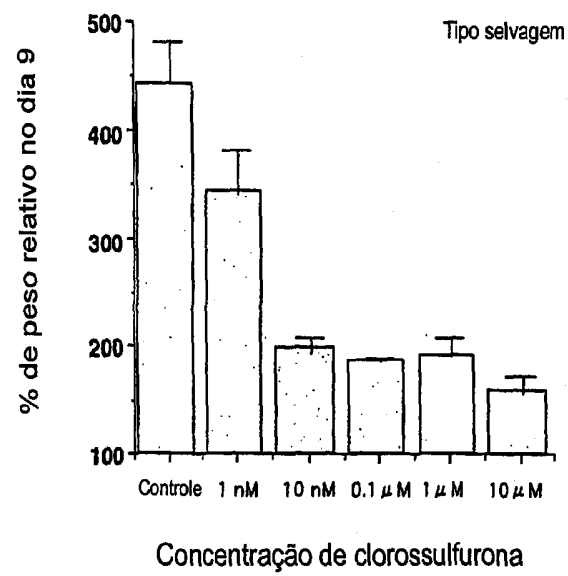


Fig. 9

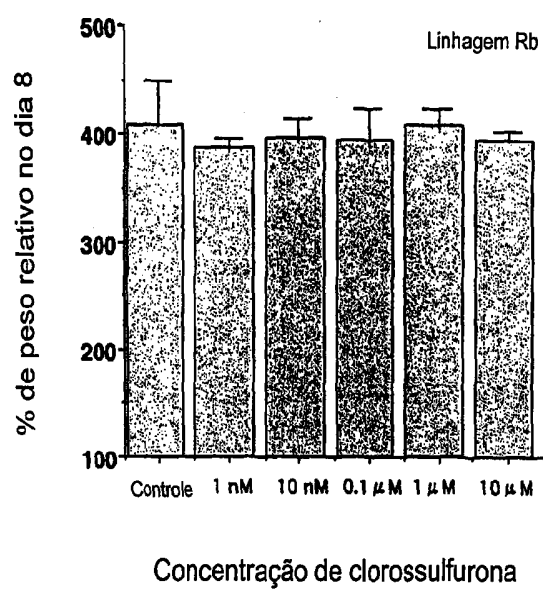


Fig. 1 0

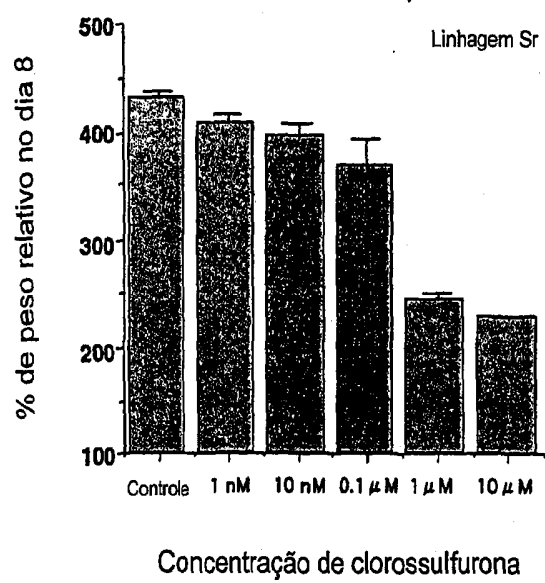


Fig. 1 1

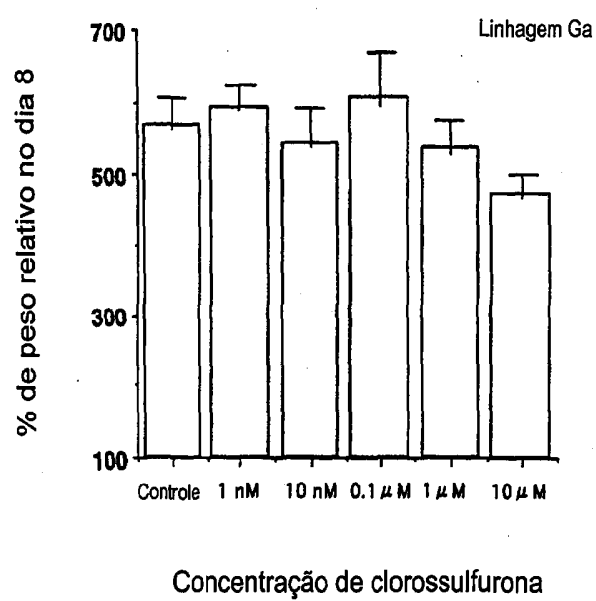


Fig. 1 2

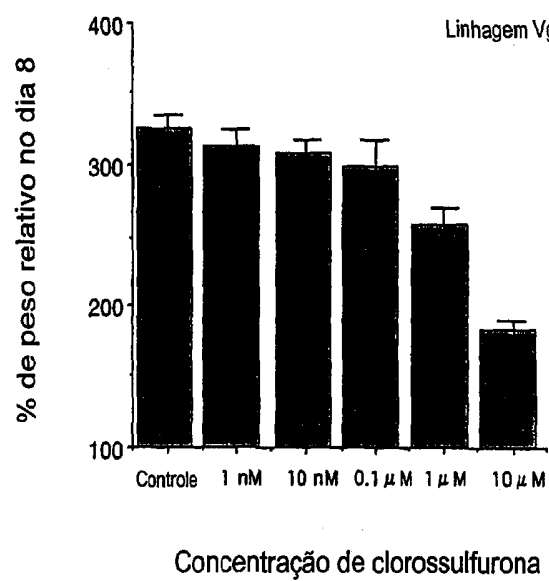


Fig. 1 3

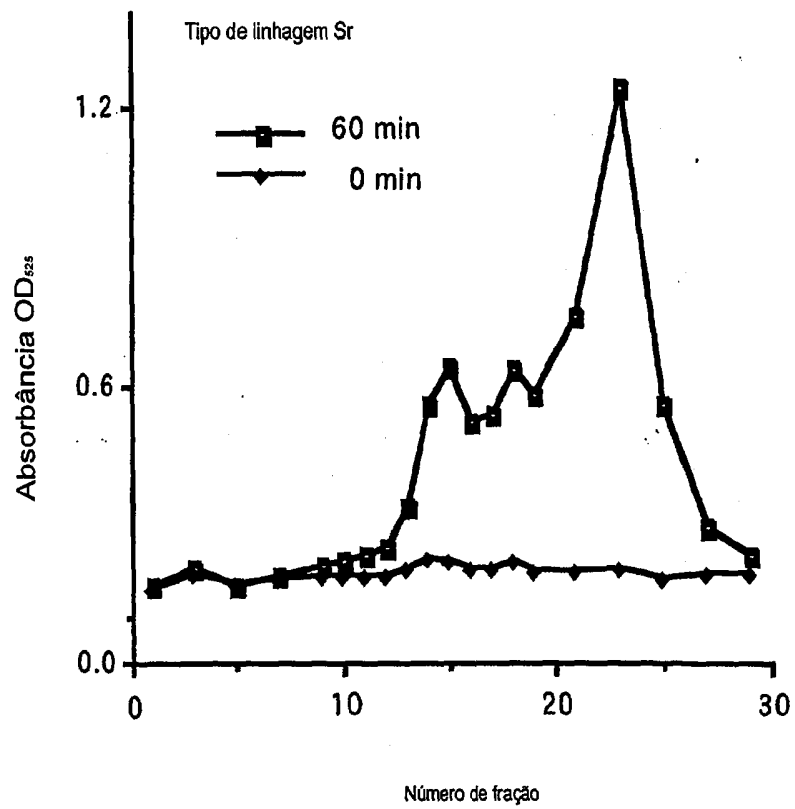


Fig. 1 4

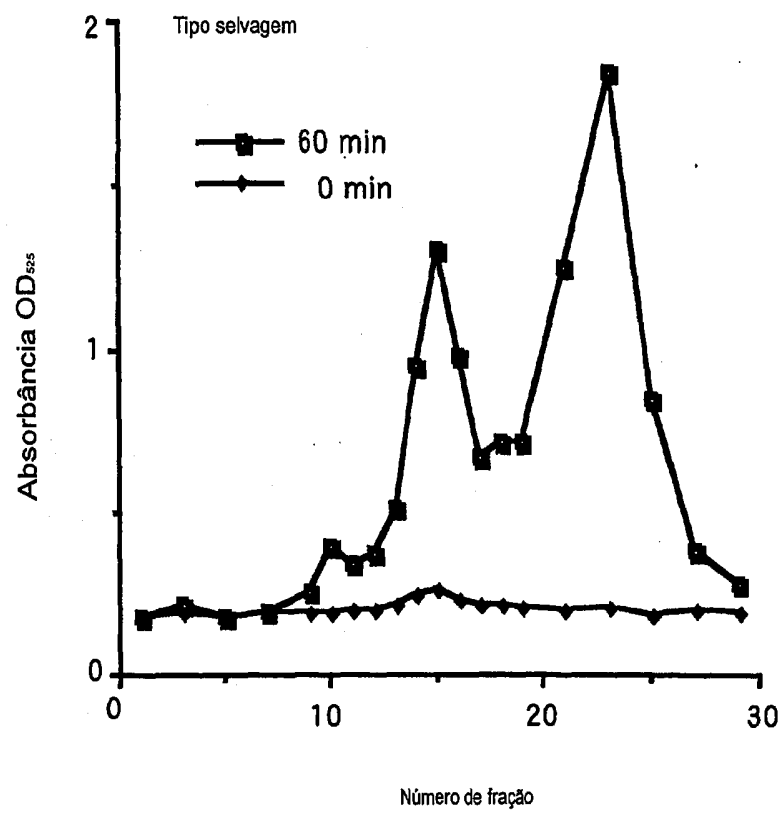


Fig. 1 5

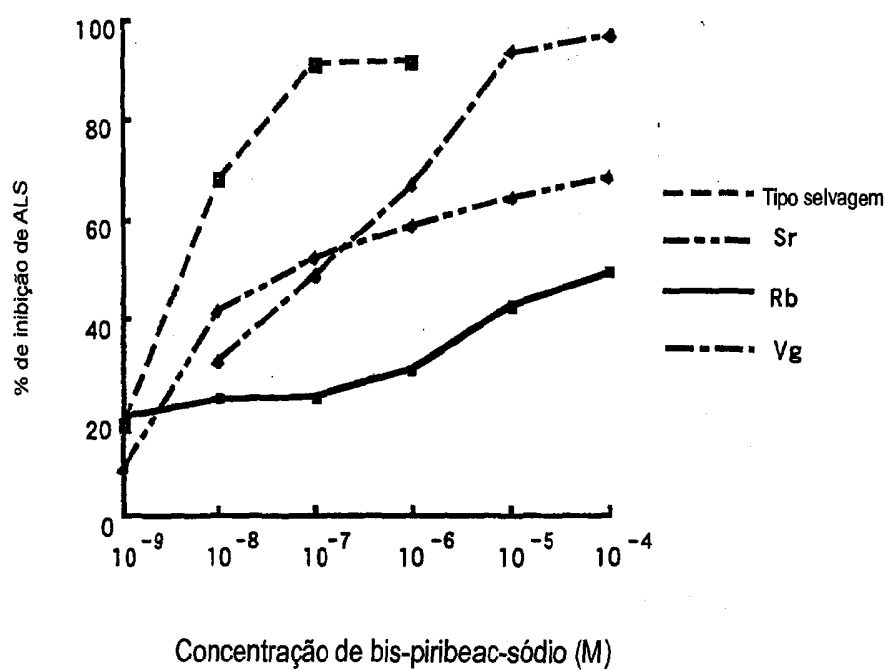


Fig. 1 6

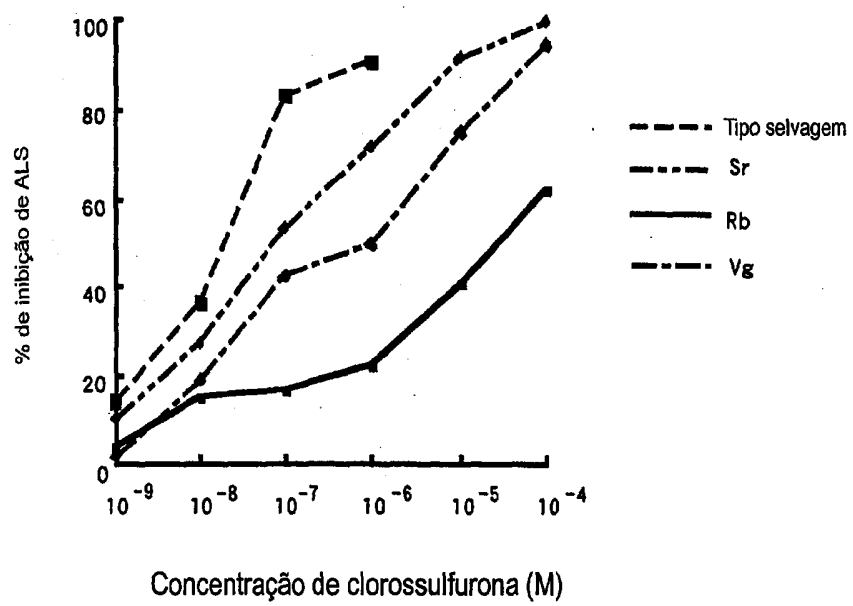


Fig. 17

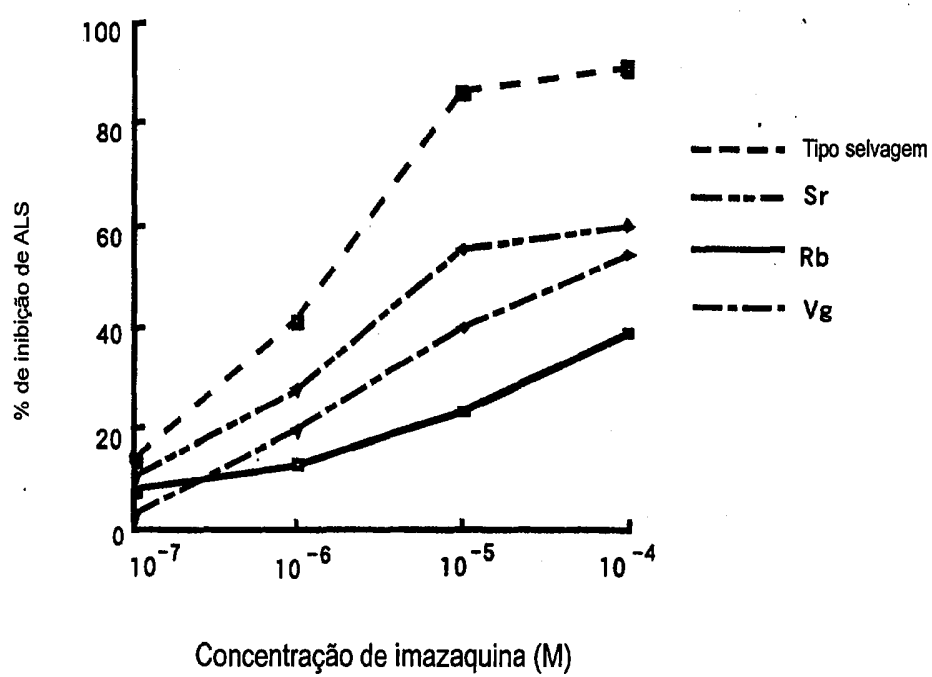


Fig. 18A

1ª sequência de nucleotídeo
Nome do arquivo : CDNA parcial de AL Snipponbare
Tamanho da sequência : 1505

2ª sequência de nucleotídeo
Nome do arquivo : ALS 1 do milho X63554
Tamanho da sequência : 2544

[illegible]

Fig. 1 8 B

2101" CACTGTTGTTGACATCGACGGAGATGGTAGCTTCCTCATGAACATTGAGGAGCTAGCTAT
 984' GATCCGCATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAACAACCAACATTTGGGTAT

 2161" GATCCGTATTGAGAACCTCCAGTCAAGGTCTTTGTGCTAAACAACCAGCACCTCGGGAT
 1044' GGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAA

 2221" GGTGGTGCAATGGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAA

 1104' CCCGGAATGTGAGAGCGAGATATATCCAGATTTTGTGACCTATTGCTAAGGGGTTCAATA
 *** **
 2281" CCCAGAGAACGAAAGTGAATATATCCAGATTTTGTG-GCAATTGCTAAGGGGTTCAACA
 1164' TTCCTGCAGTCCGTGTAAACAAGAAGAGTCAAGTCCGTGCCGCCATCAAGAAGATGCTCG

 2340" TTCAGCAGTCCGTGTGACAAAGAAGAGCGAAGTCCATGCAGCAATCAAGAAGATGCTTG
 1224' AGACTCCAGGGCCATACTTGTGGATATCATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTA
 **
 2400" AGGCTCCAGGGCCATACCTCTTGGATATAATCGTCCCGCACCAGGAGCATGTGCTGCCTA
 1284' TGATCCCAAGTGGGGGCCATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGT

 2460" TGATCCCTAGTGGTGGGCTTTCAAGGATATGATCCTGGATGGTGATGGCAGGACTGTGT
 1344' ATTAATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCCGGCTATGTTTGACCTGAATGA
 *** **
 2520" ATTGATCCGTTGACTGCAGGTGAC

Fig. 19A

1ª sequência de nucleotídeo
Nome do arquivo : cDNA de ALS de comprimento completo mutante em 2 pontos
2ª sequência de nucleotídeo
Nome do arquivo : cDNA de ALS de comprimento completo do tipo selvagem

[illegible]

Fig. 1 9 B

```

*****
1021' TGCATGGCAGGTGTACGCAATTATGCGGTGGATAAGGCTGACCTGTTGCTTGGCTTTG
1065' GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGA
*****
1081' GTGTGCGGTTTGATGATCGTGTGACAGGAAATTGAGGCTTTTGAAGCAGGGCCAAGA
*****
1125' TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAGCAACCATGTGTCAA
*****
1141' TTGTGCACATTGACATTGATCCAGCAGAGATTGGAAAGAACAGCAACCATGTGTCAA
*****
1185' TTTGGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA
*****
1201' TTTGGCAGATGTTAAGCTTGCTTTACAGGGCTTGAATGCTCTGCTACAACAGAGCACAA
*****
1245' CAAAGACAAGTTCTGATTTTATGTCATGGCACAATGAGTTGGACAGCAGAAGAGGGAGT
*****
1261' CAAAGACAAGTTCTGATTTTATGTCATGGCACAATGAGTTGGACAGCAGAAGAGGGAGT
*****
1305' TTCTCTGGGTTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTCAAGTGC
*****
1321' TTCTCTGGGTTACAAAACCTTTTGGTGAAGAGATCCACCGCAATATGCCATTCAAGTGC
*****
1365' TGGATGAGCTGACAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGTTGGGAGCAGCAGATGT
*****
1381' TGGATGAGCTGACAAAGGTGAGGCAATCATCGCTACTGGTGTGTTGGGAGCAGCAGATGT
*****
1425' GGGCGGACAAATATTACACCTACAAGCGGCAAGGCAAGTGGCTGTCTTGGCTGGTCTGG
*****
1441' GGGCGGACAAATATTACACCTACAAGCGGCAAGGCAAGTGGCTGTCTTGGCTGGTCTGG
*****
1485' GCGCAATGGGATTTGGGCTGCTGCTGACGCTGGTCTGTGTGGCTAACCCAGGTGTCA
*****
1501' GCGCAATGGGATTTGGGCTGCTGCTGACGCTGGTCTGTGTGGCTAACCCAGGTGTCA
*****
1545' CAGTTGTTGATATTGATGGGATGGTATGCTTCCTCATGAACATTCAAGAGCTGGCATTGA
*****
1561' CAGTTGTTGATATTGATGGGATGGTATGCTTCCTCATGAACATTCAAGAGCTGGCATTGA
*****
1605' TCCGATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAAACAAACATTTGGGTATGG
*****
1621' TCCGATTGAGAACCTCCCTGTGAAGGTGATGGTGTGAAACAAACATTTGGGTATGG
*****
1665' TGGTGCAATTGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACC
*****
1681' TGGTGCAATTGGAGGATAGGTTTACAAGGCGAATAGGGCGCATACATACTTGGGCAACC
*****
1725' CGGAATGTGAGAGCAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC
*****
1741' CGGAATGTGAGAGCAGATATATCCAGATTTTGTGACTATTGCTAAGGGGTTCAATATTC
*****
1785' CTGCAGTCCGTGTAACAAAGAGGTGAAGTCCGTGCCCCATCAAGAGATGCTCGAGA
*****
1801' CTGCAGTCCGTGTAACAAAGAGGTGAAGTCCGTGCCCCATCAAGAGATGCTCGAGA
*****
1845' CTCAGGGCCATAGTTGTTGATATCATGTCGCCGACAGGAGCATGTGCTGCCATATGA
*****
1861' CTCAGGGCCATAGTTGTTGATATCATGTCGCCGACAGGAGCATGTGCTGCCATATGA
*****
1905' TCCCAATTGGGGCCGATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGTGTCAGGAGCTGTGTATT
*****
1921' TCCCAAGTGGGGCCGATTCAAGGACATGATCCTGGATGGTGTGTCAGGAGCTGTGTATT
*****
1965' AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCGCGCTATGTTTGACCTGAATGACCC
*****
1981' AATCTATAATCTGTATGTTGGCAAAGCACCAGCCGCGCTATGTTTGACCTGAATGACCC
*****
2025' ATAAAGAGTGGTATGCCATATGATTTGTATGTGCTCTATCAATAAGGTGTCAAGT
*****
2041' ATAAAGAGTGGTATGCCATATGATTTGTATGTGCTCTATCAATAAGGTGTCAAGT
*****
2085' ATGAACCATATGCTCTCTGTTTACTGTTTGTATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA
*****
2101' ATGAACCATATGCTCTCTGTTTACTGTTTGTATGTGCTTGGCATGGTAATCCTAATTA
*****
2145' GCTTCTGCTGTGTAGGTTTGTAGTGTGTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA

```

Fig. 19C

```
*****
2161' GGTTCTGCTGTCTAGGTTTGTAGTGTGTTGTTTCTGTAGGCATATGCATCACAAGATA
2205' TCATGTAAGTTTCTTGCTCCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGTAAAA
*****
2221' TCATGTAAGTTTCTTGCTCCTACATATCAATAATAAGAGAATAAAGTACTTCTATGCAAAA
2265' AAAAAAAAAAAAAA
*****
2281' AAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Fig. 2 0

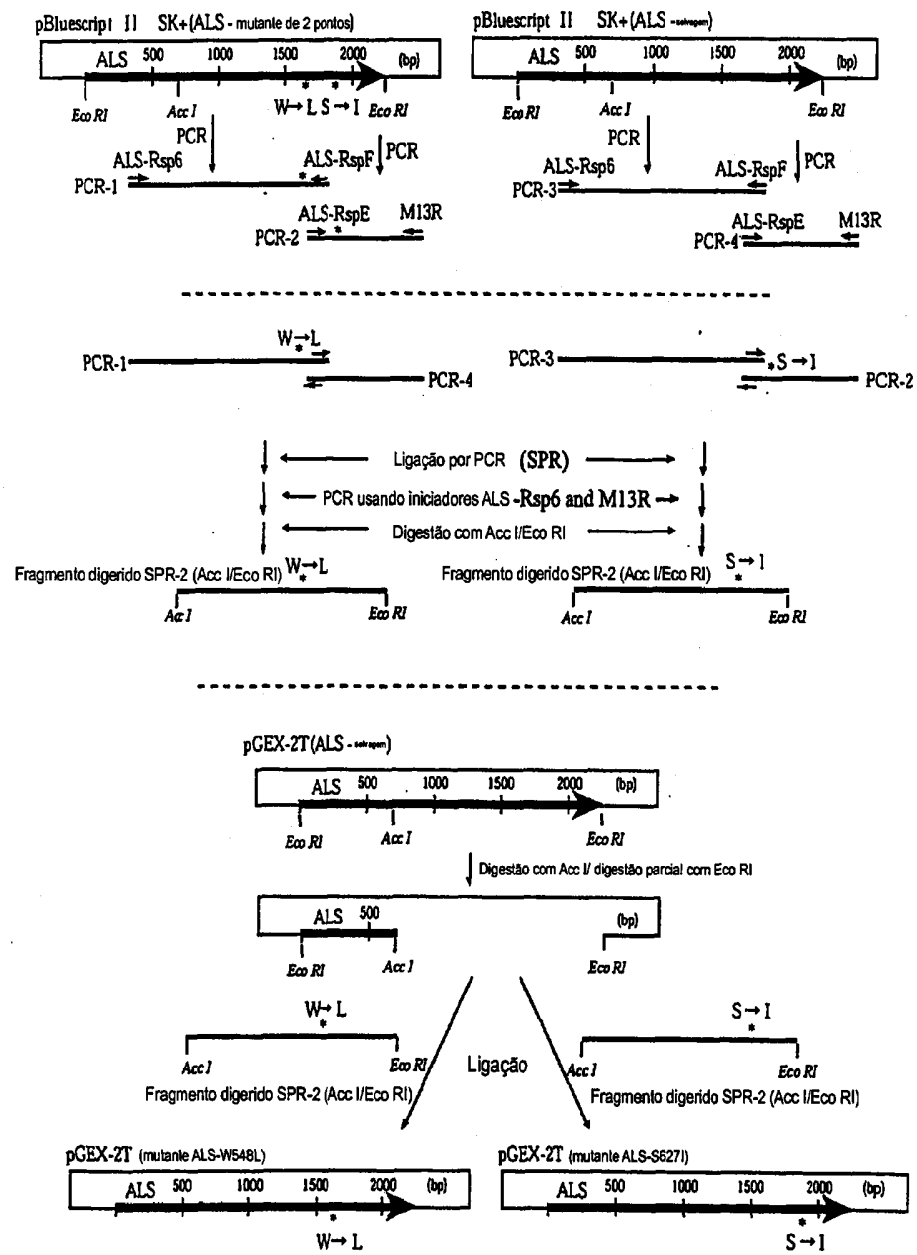


Fig. 2 1

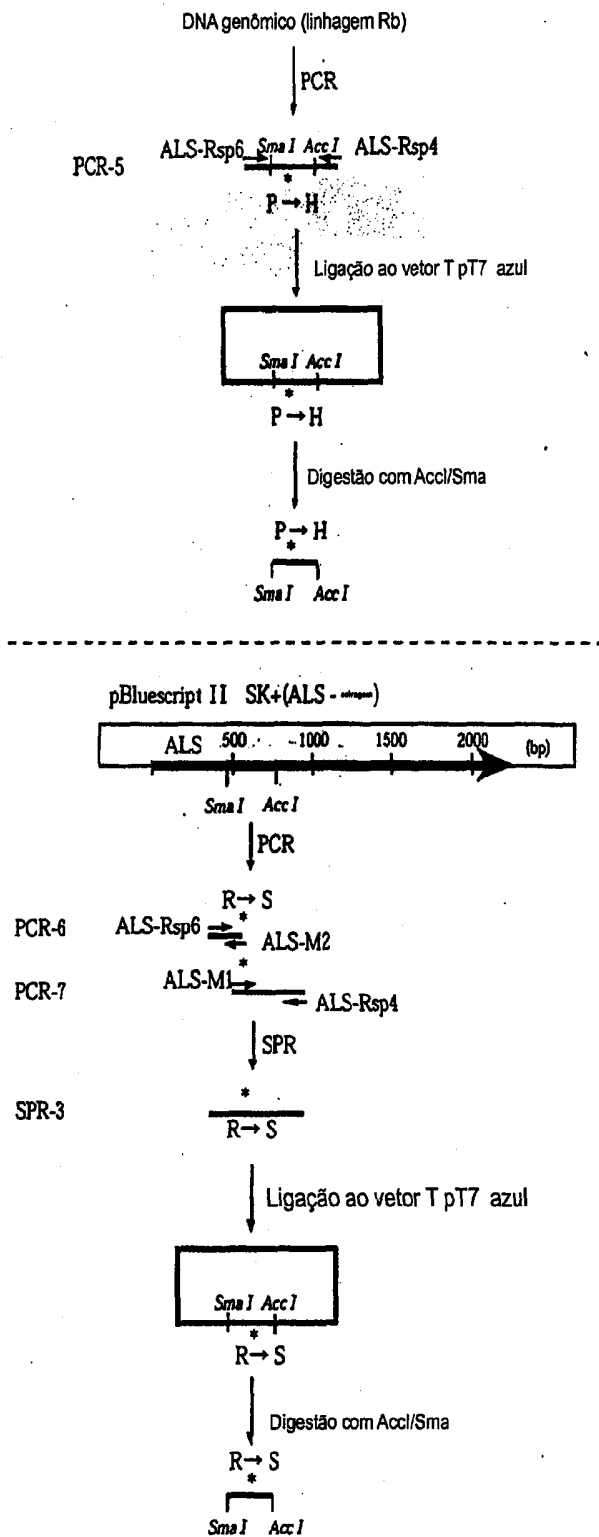


Fig. 2 2

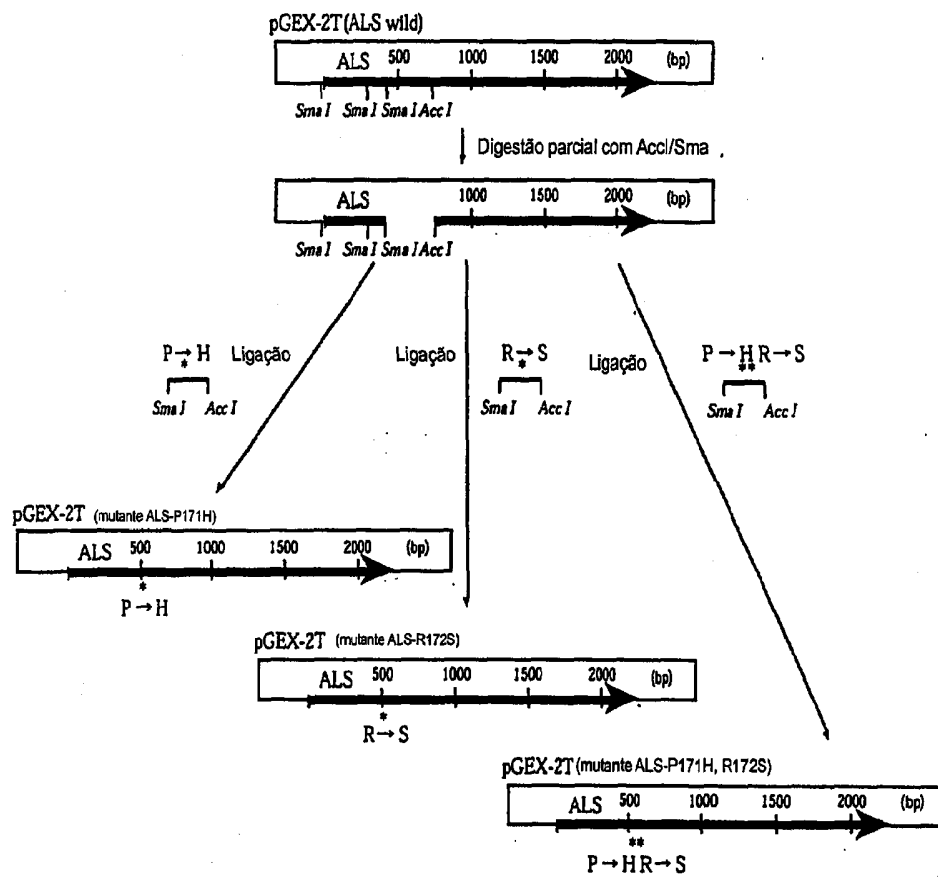


Fig. 2 3

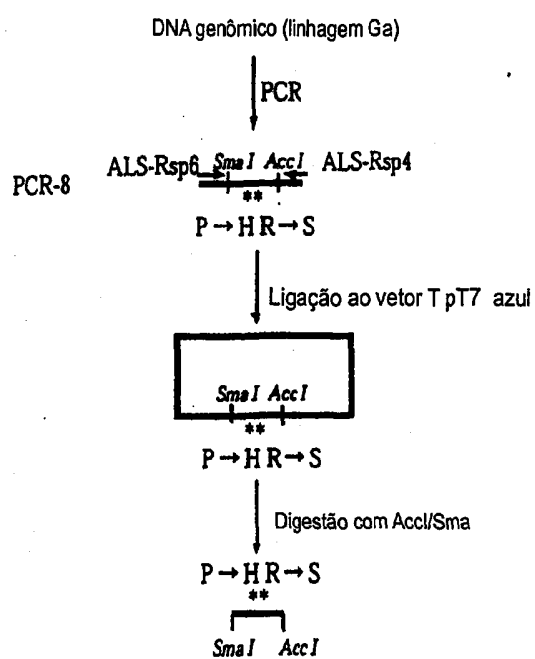


Fig. 2 4

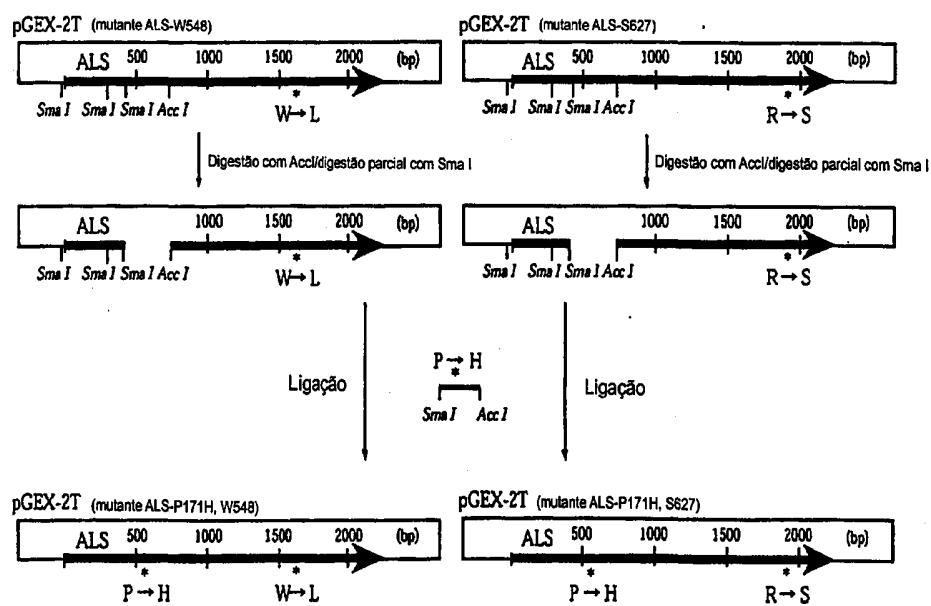


Fig. 2 5

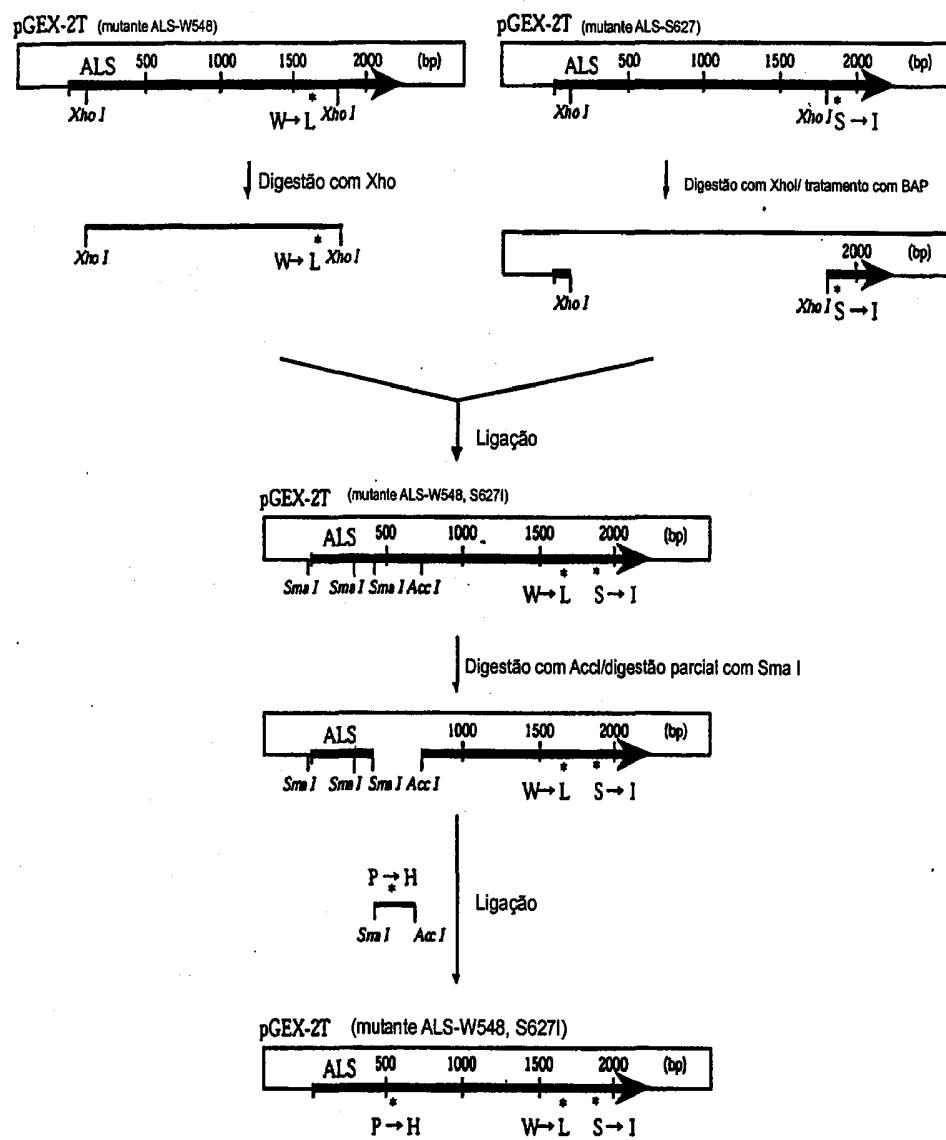


Fig. 2 6

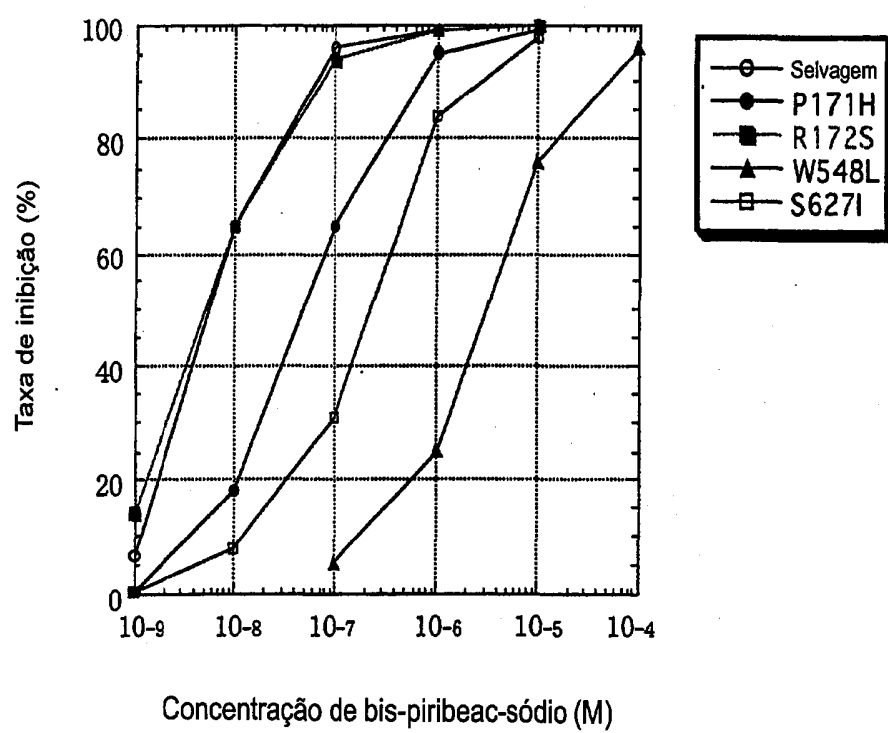
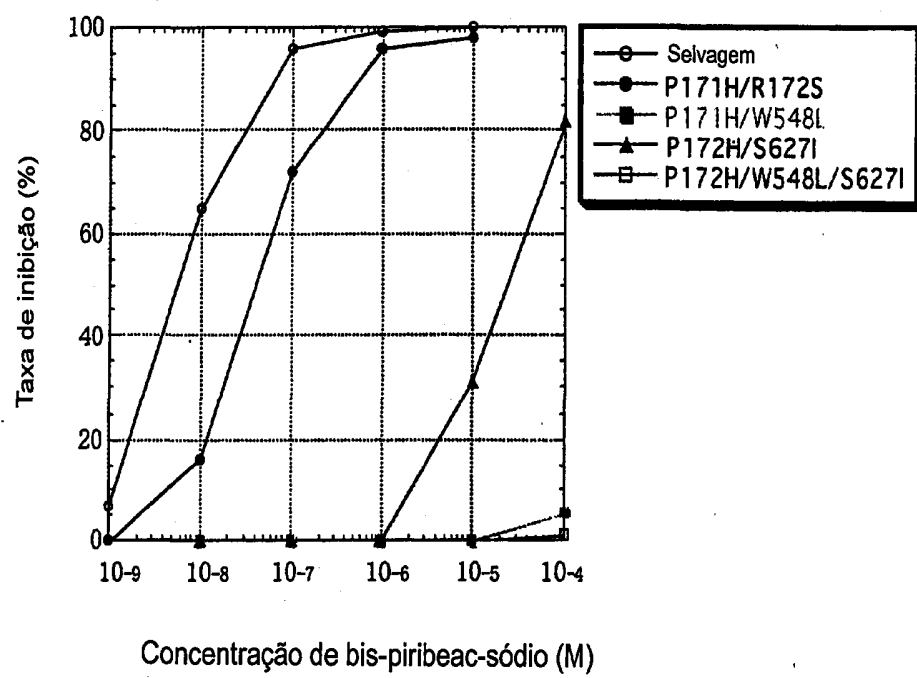


Fig. 2 7



RESUMO

Patente de Invenção: **"ÁCIDO NUCLEICO, PROTEÍNA, VETOR RECOMBINANTE, BACTÉRIA, PROCESSOS PARA CULTIVAR PLANTA QUE APRESENTA O REFERIDO ÁCIDO NUCLEICO, PARA CULTIVAR PLANTA QUE APRESENTA A REFERIDA PROTEÍNA, PARA SELEÇÃO DE CÉLULA TRANSFORMANTE QUE APRESENTA O REFERIDO ÁCIDO NUCLEICO E PARA SELECIONAR CÉLULA TRANSFORMANTE QUE APRESENTA A REFERIDA PROTEÍNA".**

A presente invenção refere-se a um gene que codifica a proteína
10 (a) ou (b) a seguir que exibe um alto nível de resistência aos herbicidas de PC ou aos herbicidas de sulfoniluréia:

(a) uma proteína que consiste em uma seqüência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 2, 4, 6 e 8;

(b) uma proteína que consiste em uma seqüência de aminoácidos derivada da seqüência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID
15 N^{os}: 2, 4, 6 e 8 através da substituição, da deleção ou da adição de pelo menos um ou mais aminoácidos, possui resistência a um herbicida de carbóxi pirimidinila e possui atividade da acetolactato sintase.