



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 285 922 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 01 N 63/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD A 01 N / 317 745 0
(31) 071146

(22) 08.07.88
(32) 08.07.87

(44) 10.01.91
(33) US

(71) siehe (73)

(72) Stalker, David, US

(73) RHONE-POULENC AGROCHIMIE, 14-20, rue Pierre Baizet, 69009 Lyon, FR

(74) Patentanwaltsbüro Berlin, Frankfurter Allee 286, Berlin, 1130, DD

(54) Von Bakterienzellbestandteilen praktisch freie Zusammensetzung für den Pflanzenschutz und Verfahren zur Gewinnung des Wirkstoffes für diese

(55) Zusammensetzung; Pflanzenschutz; Nitrilase; Bakterien; 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril; Träger; Gewinnung; K. ozaenae; Medium, lysiert, isoliert

(57) Die Erfindung betrifft eine von Bakterienzellbestandteilen praktisch freie Zusammensetzung für den Pflanzenschutz. Erfindungsgemäß enthält die Zusammensetzung eine Nitrilase aus Bakterien mit etwa 34 KDal, die im wesentlichen für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril spezifisch ist und eine spezifische Aktivität von mindestens etwa 0,1 µmol NH₃/min/mg Protein mit Bromoxynitril als Substrat aufweist und zunächst einen Träger und/oder ein Verdünnungsmittel. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Gewinnung einer für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril spezifischen Nitrilase, bei dem K. ozaenae, das eine für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril spezifische Nitrilase produziert, isoliert, in einem entsprechenden Medium gezüchtet und lysiert wird, woraufhin man die Nitrilase isoliert.

Patentansprüche:

1. Von Bakterienzellbestandteilen praktisch freie Zusammensetzung für den Pflanzenschutz, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nitrilmasse aus Bakterien mit etwa 34 KDa, die im wesentlichen für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril spezifisch ist und eine spezifische Aktivität von mindestens etwa 0,1 µmol NH₃/min/mg Protein mit Bromoxynil als Substrat aufweist und zumindest einen Träger und/oder ein Verdünnungsmittel enthält.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien-Nitrilase eine spezifische Aktivität von mindestens 0,5 µmol NH₃/min/mg Protein aufweist.
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 mit einer spezifischen Aktivität von mindestens etwa 0,1 µmol NH₃/min/mg Protein mit Bromoxynil als Substrat.
4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine praktisch reine, modifizierte Nitrilase aus Bakterien mit etwa 34 KDa, die im wesentlichen für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril spezifisch ist, eine spezifische Aktivität von mindestens etwa 0,1 µmol NH₃/min/mg Protein mit Bromoxynil als Substrat aufweist und durch mindestens eine Substitution, Abspaltung oder Extension von insgesamt nicht mehr als etwa 50 Aminosäuren modifiziert worden ist, sowie zumindest einen Träger und/oder ein Verdünnungsmittel enthält.
5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die praktisch reine Nitrilase aus *Klebsiella* stammt.
6. Verfahren zur Gewinnung einer für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril spezifischen Nitrilase für eine Zusammensetzung für den Pflanzenschutz, dadurch gekennzeichnet, daß *K. ozaenae*, daß eine für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril spezifische Nitrilase produziert, isoliert wird, *K. ozaenae* in einem entsprechenden Medium gezüchtet und *K. ozaenae* lysiert und die Nitrilase isoliert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft eine von Bakterienzellbestandteilen praktisch freie Zusammensetzung für den Pflanzenschutz und ein Verfahren zur Gewinnung des Wirkstoffes dieser Zusammensetzung.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die Bromoxynil- und/oder -loxylin-spezifischen Nitrilase können zur Entgiftung von mit Bromoxynil und verwandten Herbiziden verunreinigten Stellen und zum Schutz von Wirtzellen vor der zytotoxischen Wirkung dieser Herbizide verwendet werden. Die Konstruktionen können zur Unterscheidung von diese Strukturen enthaltenden Wirtzellen und Wirtzellen, die diese Konstruktion nicht enthalten, verwendet werden.

Die Möglichkeit, Mikroorganismen und Zellen höherer Organismen neue genetische Fähigkeiten zu verleihen, hat eine Vielzahl von neuen Anwendungsgebieten eröffnet. Eines dieser Gebiete betrifft verschiedene Mittel, die wegen ihrer zytotoxischen Wirkung verwendet werden, wie beispielsweise viele Verbindungen, die in der Landwirtschaft zur Schädlingsbekämpfung und/oder Unkrautvernichtung eingesetzt werden. In vielen Fällen haben diese Verbindungen eine relativ lange Verweilzeit oder hinterlassen einen beträchtlichen Rückstand.

In vielen Fällen ist es erwünscht, zwischen zu erhaltenden Arten und solchen, die vertilgt werden müssen, zu unterscheiden. So ist es oft erwünscht, Unkraut selektiv zu vernichten, wobei die Ernte möglichst wenig beeinträchtigt werden sollte. In den meisten Fällen haben viele der Breitband-Herbizide einen sehr nachteiligen Einfluß auf die Ernte, so daß ihre Verwendung auf eine Voremergenz- oder vorsichtige Postemergergenz-Anwendung begrenzt ist.

Es bestand daher großes Interesse, lebende Zellen so verändern zu können, daß sie gegenüber Beanspruchungen, wie durch zytotoxische Mittel, widerstandsfähig sind.

In der US-PS 4535060 wird die Verwendung eines bakteriellen *aroA*-Gens beschrieben, das glyphosatempfindlichen Zellen Glyphosat-Resistenz verleiht. Hsu und Camper, „Can. J. Microbiol.“, 22, S. 537-543 (1976) beschreiben die Isolierung von loxylin-„Abbauern“ aus mit Erde angereicherten Kulturen. Hsu und Clemson, „Dissert. Abstr. Intern.“, B36, Nr. 8, S. 3708 (1976) beschreiben den mikrobiellen Abbau einer Familie von 3,5-Dihalogen-4-hydroxybenzonitril-Herbiziden. Ingram und Pullin, „Pestic. Sci.“, 5, S. 287-291 (1974) beschreiben den längeren Verbleib von Bromoxynil in drei Bodenarten. Smith, „Abstr. Meeting Weed Soc. Am.“ (1971), S. 16-17 beschreibt den Abbau von Bromoxynil in schwerem Ton (Regina heavy clay). Smith und Flether, „Hort. Res.“, 4, S. 60-62 (1964) berichten von 3,5-Dihalogen-4-hydroxybenzonitrilen und Bodenorganismen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, eine neue, von Bakterienzellbestandteilen praktisch freie Zusammensetzung, die Nitrilasen als Wirkstoff enthält, und ein Verfahren zur Herstellung des Wirkstoffes bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß enthält die Zusammensetzung neben zunächst einem Träger oder einem Verdünnungsmittel eine Nitrilase aus Bakterien mit etwa 34 KDa, die in wesentlichen für 3,5-dihalogeniertes p-Hydroxybenzonitril spezifisch ist und eine spezifische Aktivität von mindestens etwa 0,1 $\mu\text{mol NH}_3/\text{min}/\text{mg}$ Protein mit Bromoxynil als Substrat aufweist.

Im Rahmen der Erfindung wurden neue DNA-Sequenzen, Konstruktionen, transformierte Zellen, Pflanzen und Peptide, die halogenierte Hydroxybenzonitrile und insbesondere 3,5-Dibrom- oder 3,5-Dijod-4-hydroxybenzonitril hydrolysieren beschrieben. Beschrieben wird ferner ein Enzym, das das Nitril hydrolysieren kann, so daß die herbizide Wirkung des Nitrils verhindert wird und eine Zelle oder ein Wirt, die gegenüber dem Herbizid empfindlich sind, geschützt werden oder eine mit dem Herbizid verunreinigte Stelle entgiftet wird.

Das Strukturgen kann aus einem einzelligen Mikroorganismus gewonnen werden und insbesondere aus einem Bakterium, daß das Benzonitril als Stickstoffquelle und im allgemeinen als ausschließliche Stickstoffquelle verwenden kann.

Im folgenden wird als „Benzonitril“ ein halogeniertes p-Hydroxybenzonitril und insbesondere 3,5-Dijod- oder 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonitril und als „Nitrilase“ eine Nitrilase verstanden, die dieses halogenierte Benzonitril als Stickstoffquelle und insbesondere als ausschließliche Stickstoffquelle verwenden kann. Das Enzym kann auf verschiedene Weisen erhalten werden, zweckmäßigerweise aus Bakterien, die an einer Bromoxynil oder Ioxynil enthaltenden Stelle natürlich vorkommen. Von Interesse sind Enterobakterien und insbesondere die Art *Klebsiella*. *Klebsiella pneumoniae* und insbesondere die Art *ozaenae* kann eingesetzt werden. Besser als sie aus dem Boden zu isolieren, werden die Organismen im Boden oder andere Medien mit höher werdenden Konzentrationen an Benzonitril und verminderten Mengen an anderen Stickstoffquellen gezüchtet, bis überlebende Organismen erhalten werden, die Benzonitril als einzige Stickstoffquelle verwenden.

Unabhängig von den die Nitrilase enthaltenden Bakterien muß selektioniert werden, um zu gewährleisten, daß die Nitrilase bei der Benzonitril-Entgiftung wirksam ist. Zusätzlich sollte die Nitrilase für dieses Benzonitril eher als für analoge Verbindungen, denen die Halogen- oder andere Substituenten fehlen, spezifisch sein. Die erfindungsgemäße Nitrilase ist daher für Benzonitrile, wie angegeben, spezifisch und relativ inaktiv oder wesentlich weniger aktiv für analoge Verbindungen.

Zweckmäßigerweise sollte bei Kultivierung mit Benzonitril als Stickstoffquelle bei vergleichbaren Konzentrationen die Proliferationsgeschwindigkeit nicht deutlich niedriger sein, d. h. nicht mehr als 10% vermindert, als die Proliferationsgeschwindigkeit des Bakteriums in Gegenwart einer normalen Stickstoffquelle, wie beispielsweise Ammoniak. Dieses Ergebnis wird mit nichtspezifischen Benzonitrilen nicht beobachtet.

Sind der Wirtstamm oder die Wirtstämme einmal identifiziert, so können verschiedene Verfahren zur Identifizierung der Codiersequenz der Nitrilase eingesetzt werden. Das Gen kann auf einem Chromosom oder einem Plasmid vorhanden sein. Das Genom wird fragmentiert, insbesondere mit einer Restriktionsendonuklease, wobei eine oder mehrere Endonukleasen eingesetzt werden können, um Fragmente von etwa 5 bis 50 KB herzustellen. Diese Fragmente können auf entsprechenden Vektoren in einem geeigneten Bakterium, wie *E. coli*, kloniert werden, die entstandenen Transformanten werden auf Nitrilaseaktivität selektioniert, wobei der Wirtorganismus einen negativen Hintergrund abgibt.

Steht fest, daß ein oder mehrere Klone Nitrilaseaktivität aufweisen, so können die das gewünschte DNA-Fragment enthaltende extrachromosomalen Elemente, Plasmide oder Viren in herkömmlicher Weise isoliert werden, z. B. durch Lyse des Wirts, Ausschälen der DNA und Abtrennen der Vektor-DNA, Plasmid- oder Virus-DNA von der chromosomalen DNA. Die extrachromosomalen Elemente können durch Restriktionsendonukleasen gespalten werden, die gewünschten Fragmente können durch verschiedene Verfahren zur Trennung und Identifizierung der Fragmente verschiedener Größe, wie Elektrophorese oder Dichtegradienten-Zentrifugieren, isoliert werden.

Das Fragment wird je nach Größe weiter manipuliert, um es an die Größe des Gens und seiner flankierenden Regulatorregionen anzupassen. Es gibt verschiedene Verfahren zur Manipulation des Fragments, das die für das Enzym codierende Sequenz und ihre flankierenden Regulatorsequenzen enthält, beispielsweise Teilsplattung mit verschiedenen Restriktionsenzymen in verschiedenen Reaktionsgemischen und anschließendes Klonen der Fragmente zur Bestimmung, in welchen Fragmenten die Fähigkeit zur Expression der Nitrilase zurückbleibt.

Das Enzym kann aber auch isoliert und teilsequenziert werden. Auf der Basis der Aminosäuresequenz können Sonden hergestellt werden, die zur Identifizierung der das Gen enthaltenden Fragmente verwendet werden können. Durch Kombinieren dieser Annäherung mit der Spaltung mit Restriktionsenzymen können Fragmente geklont und auf die Anwesenheit des gewünschten Gens selektioniert werden. Außerdem können Exonukleasen, wie Bal31, verwendet werden, um die Nukleotide an einem oder beiden Enden des Fragments zu entfernen und die Anzahl der überflüssigen Nukleotide weiter zu verringern.

Alternativ kann das Gen in einem geeigneten Wirt geklont und die Boten-RNA (mRNA) durch Selektionieren mit einer Sonde, Identifizieren in einem entsprechenden In-vitro- oder In-vivo-Translationssystem, beispielsweise *Xenopus* oocytes oder Reticulolysat, isoliert werden. Die isolierte mRNA kann dann zur Herstellung von cDNA unter Einsatz herkömmlicher Verfahren, wie reverse Transkriptase und Bildung der Komplementärkette mit DNA-Polymerase, verwendet werden. In diesen Fall fehlen dem entstandenen Strukturgen die an die Transkription gebundenen Regulatorregionen.

Das Nitrilasegen kann auf verschiedene Weise modifiziert werden, entweder durch Verkürzen oder Verlängern eines oder beide der 5'- und/oder 3'-Enden. Im allgemeinen sind nicht mehr als 25, insbesondere nicht über etwa 20 Codons an der natürlich vorkommenden Nitrilase beteiligt. Die Nitrilase kann um bis zu 50 Aminosäuren, im allgemeinen nicht über etwa 30 Aminosäuren, verlängert werden. Kombinationen von Substitution, Abspaltung und Extension können eingesetzt werden. Das heißt, das Gen kann auf verschiedene Weisen manipuliert werden, um beispielsweise die Eigenschaften des Enzyms zu ändern oder es für Manipulationen der Plasmide geeigneter zu machen.

Die DNA-Sequenz, die das die Nitrilase exprimierende Strukturgen enthält, kann an viele andere DNA-Sequenzen zur Einführung in eine entsprechende Wirtszelle gebunden werden. Die Begleitsequenz hängt von der Art des Wirts, der Einführungsweise der DNA-Sequenz in den Wirt und davon ab, ob episomale Aufrechterhalten oder Integration erwünscht ist.

Für prokaryontische Wirte gibt es viele Vektoren, die zur Einführung durch Transformation, Konjugation, Transduktion oder Transfektion der DNA-Sequenz in einen prokaryontischen Wirt verwendet werden können. DNA-Sequenzen umfassen eine Vielzahl von Plasmiden, wie pBR 322, pACYC 184, pMB9 oder pRK 290, Cosmide, wie pVK 100 oder Viren, wie P22.

Für eukaryontische Zellen können verschiedene Verfahren zur Einführung der DNA in den Wirt eingesetzt werden, wie Transformation mit Ca^{++} -ausgefällter DNA, wobei eine nichtreplikative DNA-Sequenz, ein Plasmid oder ein Minichromosom beteiligt sind, Transformation mit einer T-DNA enthaltenden Sequenz in Agrobakterium, Mikroinjektion mit einer Mikropipette oder Elektroporation. Es hängt davon ab, ob ein kompetentes Replikationssystem in der DNA-Konstruktion vorhanden ist, ob die DNA als episomales Element repliziert oder in das Wirtgenom integriert und das Strukturgen im Wirt exprimiert wird. Es können episomale Elemente, wie tumorinduzierende Plasmide, beispielsweise Ti oder Ri, oder ihre Fragmente, oder Viren, wie CaMV oder TMV, oder ihre Fragmente verwendet werden, die für den Wirt nicht tödlich sind und in denen das Strukturgen in solchen episomalen Elementen vorhanden ist, daß es die Expression des Strukturgens ermöglicht. Von besonderem Interesse sind Fragmente mit Replikationsfunktion, denen andere Funktionen, wie Onkogenese oder Virulenz fehlen.

Die aus der Nitrilase erhaltenen Fragmente können unter Verwendung eines geeigneten Klonierungsvektors geklont werden. Das Klonen kann in einem geeigneten einzelligen Mikroorganismus, beispielsweise einem Bakterium, wie E. coli, durchgeführt werden. Zweckmäßigerweise wird ein Cosmid verwendet, wobei durch Teil- oder Vollspaltung Fragmente mit der gewünschten Größe entstehen. Beispielsweise kann das Cosmid pVK100 mit einem geeigneten Restriktionsenzym teilgespalten und an Fragmente gebunden werden, die entweder durch Teil- oder Vollspaltung eines Plasmids, Chromosoms oder deren Fragment entstanden sind. Durch Verpackung wird gewährleistet, daß nur Fragmente der gewünschten Größe verpackt und in den Wirtorganismus transduziert werden.

Der Wirtorganismus wird anhand der Benzonitril-Resistenz ausgewählt. Die aufnehmenden Stämme können so verändert werden, daß sie geeignete genetische Merkmale aufweisen, die die Selektion von Transduktanten ermöglichen. Bei Mikroorganismen können die Transduktanten zur Konjugation mit anderen Mikroorganismen unter Verwendung, bei Bedarf, eines mobilisierenden Plasmids eingesetzt werden. Zur weiteren Verminderung der Größe des das Strukturgen für die Nitrilase enthaltenden Fragments können verschiedene Verfahren eingesetzt werden. So kann beispielsweise der Cosmidvektor isoliert, mit einer Vielzahl von Restriktionsendonukleasen, wie EcoRI, BglII oder SmaI, gespalten werden und die entstandenen Fragmente in einen entsprechenden Vektor, zweckmäßigerweise in den vorher verwendeten Cosmidvektor, geklont werden. Anstelle eines Cosmidvektors stehen viele Klonierungsvektoren geringer Größe, wie pACYC177 und pACYC184, zur Verfügung. Das heißt, Fragmente von vorzugsweise unter etwa 5 KB, im allgemeinen unter etwa 4 KB und insbesondere unter etwa 2 KB, können geklont werden und gewähren Benzonitrilresistenz.

Zweckmäßigerweise enthält das Fragment etwa 1 KB und unter etwa 5 KB, vorzugsweise unter etwa 4 KB, insbesondere mindestens etwa 1047 Basenpaare (BP), insbesondere einschließlich der flankierenden Regionen mindestens etwa 1100 BP, vorzugsweise unter etwa 1,5 KB. Von besonderem Interesse ist ein BglII-SmaI-Fragment aus Klebsiella ozaenae und insbesondere ein PstI-HincII-Fragment mit etwa 1210 BP.

Von besonderem Interesse ist eine Verkürzung des Nitrilasegens bis zu etwa 5 Codons am 5'-Ende und bis etwa 10 Codons am 3'-Ende oder das Zuführen bis zu etwa 50, im allgemeinen nicht über etwa 30 und vorzugsweise nicht über 20 Codons am 5'- und/oder 3'-Ende. Das heißt, das entstandene Enzym kann vom natürlich vorkommenden Enzym durch bis zu 50 Aminosäuren, im allgemeinen nicht über etwa 30 Aminosäuren und vorzugsweise nicht über etwa 25 Aminosäuren verschieden sein, wobei eine Kombination von Substitution, Extension und Abspaltung durchgeführt wird.

Die Nitrilase kann in jeder geeigneten Quelle, entweder in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen, wie Bakterien, Hefe, Schlauchpilzen oder Pflanzenzellen, exprimiert werden. Wo keine Sekretion erhalten wird, kann das Enzym durch Lyse der Zellen in bekannter Weise isoliert werden. Geeignet sind beispielsweise die Chromatographie, Elektrophorese oder Affinitätschromatographie. Zweckmäßigerweise wird Bromoxynil über eine entsprechende funktionelle Gruppe, wie die Carboxyl-Gruppe, an einen unlöslichen Träger gebunden und als Verpackung für die Isolierung der Nitrilase verwendet. Die spezifische Nitrilaseaktivität beträgt mindestens etwa 0,1 µmol Ammoniak/min/mg Protein, im allgemeinen mindestens etwa 0,5 oder mehr µmol Ammoniak/min/mg Protein unter Bedingungen, wie sie von Harper, „Biochem. J.“, 167, S. 685-692 (1977) beschrieben werden.

Das gereinigte Enzym kann in vielerlei Weisen verwendet werden: es kann beispielsweise direkt in Untersuchungen auf Bromoxynil, Ioxynil oder andere verwandte Benzonitrile verwendet werden. Es kann aber auch als Nachweis in diagnostischen Versuchen dienen, z. B. dadurch, daß es an eine zu untersuchende Substanz, wie ein Hapten oder Antigen, oder einen Antikörper, gebunden wird. Diese Versuche sind in den US-PS 3654090, 3817837 und 3850752 beschrieben, in denen die Konjugation sowie die Bestimmung der Konzentration der zu untersuchenden Substanz eingehend erläutert sind (die entsprechenden Teile dieser Beschreibungen sind hier miteinbezogen).

Die die Nitrilase codierende DNA-Sequenz kann in verschiedenen Weisen verwendet werden, beispielsweise zur Isolierung des Wildtyps oder von Nitrilase-Mutanten.

Sie kann aber auch zur Integration durch Rekombination in einen Wirt eingesetzt werden, wobei dem Wirt Benzonitrilresistenz verliehen wird.

Die Pflanzenzellen kann das Strukturgen als Teil einer Konstruktion in einen Pflanzenzellkern durch Mikropipetteninjektion zur Integration durch Rekombination in das Wirtgenom eingeführt werden. Alternativ kann auch die Elektroporation zur Einführung des Strukturgens in eine Pflanzenwirtszelle verwendet werden. Wurde das Strukturgen aus einer Quelle mit Regulatorsignalen erhalten, die von dem Pflanzenwirt nicht erkannt werden, so müssen die entsprechenden Regulatorsignale für die Expression eingeführt werden. Wird ein Virus oder Plasmid, beispielsweise ein tumorinduzierendes Plasmid, verwendet, das kartiert worden ist, so kann eine Schnittstelle gewählt werden, die stromabwärts von einem Promotor liegt und in die das Strukturgen in die das Strukturgen in einer entsprechenden Entfernung vom Promotor eingefügt werden kann. Weisen die DNA-Sequenzen keine geeignete Schnittstelle auf, so können sie mehrmals mit einer Exonuklease, wie Bal31, gespalten und eine synthetische Endonukleaseschnittstelle (Linker) eingeführt werden.

Von besonderem Interesse ist die Verwendung eines tumorinduzierenden Plasmids, z. B. Ti oder Ri, mit dem das Nitrilasegen in Pflanzenzellchromosomen eingeführt werden kann. Die Verwendung von Ti- und Ri-Plasmiden ist in PCT-A-WO 84/02913, 02919 und 02920 sowie EP-A-0116718 sowie bei Matzke und Chilton „J. Mol. App. Genetics“, 1, S. 39-49 (1981) beschrieben.

Durch Verwendung des rechten Rands oder beider Ränder der T-DNA, d. h. der Ränder, die eine Expressionskassette flankieren, die das Nitrilase-Strukturgen und die Transkriptions- und Translations-Regulatorsignale für den Start (Initiation) und das Ende (Termination) umfassen und die vom Pflanzenwirt erkannt werden, kann die Expressionskassette in das Pflanzen genom integriert werden und die Expression der Nitrilase in der Pflanzenzelle bei verschiedenen Differenzierungsstufen ermöglicht werden.

Verschiedene Konstruktionen können für die Expression in Pflanzenzellen hergestellt werden. Dabei wird eine Expressionskassette zur Verfügung gestellt, die in Pflanzen zur Expression der Nitrilase im Pflanzenwirt funktionell ist. Für die Transkription können viele Transkriptionsstartregionen (Promotorregionen), entweder konstitutive oder induzierbare, eingesetzt werden.

Die Transkriptionsstartregion ist an das die Nitrilase codierende Strukturgen gebunden und gewährleistet die Transkriptionsinitiation stromaufwärts vom Initiationscodon, normalerweise innerhalb etwa 200 Basen des Initiationscodons, dort, wo der nicht übersetzten (nicht translatierten) 5'-Region ein ATG fehlt.

Das 3'-Ende des Strukturgens hat ein oder mehrere Stopcodons, die an eine Transkriptionsendregion, die in einem Pflanzenwirt funktionell ist, gebunden sind, wobei die Endregion mit dem gleichen oder verschiedenen Strukturgenen wie die Startregion verbunden ist.

Die Expressionskassette ist dadurch gekennzeichnet, daß sie in Richtung der Transkription der Startregion das Strukturgen unter der Transkriptionskontrolle der Startregion und der Endregion für die Beendigung der Transkription und die Herstellung der m-RNA, wenn es angebracht ist, enthält.

Als Transkriptions- und Translations-Regulatorregionen können zweckmäßigerweise Opine-Promotor- und Terminator-Regionen verwendet werden, die eine konstitutive Expression des Nitrilasegens gewährleisten. Es können aber auch andere Promotoren und/oder Terminatoren eingesetzt werden, insbesondere Promotoren, die eine induzierbare Expression oder regulierte Expression in einem Pflanzenwirt ermöglichen. Geeignete Promotorregionen aus Ti-Plasmid sind Opinepromotoren, wie beispielsweise der Octopine-Synthase-Promotor, Nopaline-Synthase-Promotor, Agropine-Synthase-Promotor oder Mannopine-Synthase-Promotor. Andere Promotoren sind Virus-Promotoren, wie CaMV-Region VI-Promotor oder der Promotor mit der Gesamtlänge (35S), Promotoren, die mit Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylat-Genen verbunden sind, beispielsweise die kleine Untereinheit, oder Gene, die mit Phaseolin, Proteinspeicherung, B-Conglycinin oder Zellulosebildung verbunden sind.

Die verschiedenen Sequenzen können in herkömmlicher Weise aneinander gebunden werden. Die Promotorregion kann durch die Region am 5'-Ende des Strukturgens, z. B. das Opingen, und durch Restriktionskartierung und Sequenzierung identifiziert werden; sie kann selektioniert und isoliert werden. Entsprechend kann die Terminatorregion als 3'-Region aus dem Strukturgen isoliert werden. Die Sequenzen können geklont und in der richtigen Orientierung aneinandergebunden werden, sie ermöglichen die konstitutive Expression des Nitrilasegens in einem Pflanzenwirt.

Durch Einführen eines funktionellen, die Nitrilase exprimierenden Gens in Kulturpflanzen können Bromoxynil, Ioxynil und analoge Herbizide bei einer Vielzahl von Ertragspflanzen bei Konzentrationen verwendet werden, die die vollständige oder praktisch vollständige Unkrautvernichtung gewährleisten, ohne die Ernte wesentlich zu beeinträchtigen. Auf diese Weise können wirtschaftliche Vorteile erreicht werden, da Düngemittel und Wasser wirkungsvoller eingesetzt und die auf der Anwesenheit von Unkraut beruhenden Nachteile vermieden werden.

Die die Nitrilase exprimierende Expressionskassette kann in eine Vielzahl von Pflanzen eingeführt werden, sowohl einkeimblättrige wie auch zweikeimblättrige, einschließlich Mais, Weizen, Sojabohnen, Tabak, Baumwolle, Tomaten, Kartoffeln, Brassica-Arten, Reis, Erdnüsse, Petunien, Sonnenblumen, Zuckerrüben oder Rasen. Die Gene können in Zellen oder Pflanzenteilen vorhanden sein, wie Callus, Gewebe, Wurzeln, Knollen, Schößlinge, Stecklinge, Samen, Blätter, Keimlinge oder Pollen.

Um den Pflanzen Benzonitrilresistenz zu verleihen, können verschiedene Formulierungen zum Schutz der Ertragspflanzen vor Unkraut und folglich zur Erhöhung der Ernte und zur Verminderung des Wettbewerbs um Nährstoffe verwendet werden. Beispielsweise kann Bromoxynil als solches für die Postemergenzkontrolle des Unkrauts bei „sicheren“ Kulturpflanzen, wie Sonnenblumen, Sojabohnen, Getreide oder Baumwolle, oder alternativ in Kombination mit anderen Produkten eingesetzt werden.

Es können übliche Mengen an Pestiziden auf Feldern verwendet werden in Formulierungen, die etwa 0,05 bis 1,98 kg/0,4 ha (0,1 bis 4 Pfund/a), vorzugsweise 0,09 bis 0,9 kg/0,4 ha (0,2 bis 2 Pfund/a) Bromoxynil abgeben, und das andere Herbizid in solchen Mengen enthalten, daß sie etwa 0,05 bis 1,98 kg/0,4 ha (0,1 bis 4 Pfund/a) Wirkstoff abgeben. Die Formulierungen können andere Hilfsstoffe, wie Reinigungsmittel, Hilfsmittel, Sprühhilfsmittel, Haftmittel oder Stabilisierungsmittel enthalten. Die Formulierungen können entweder naß oder trocken angewendet werden, beispielsweise als fließfähige Pulver, emulgierbare oder flüssige Konzentrate, wie sie an sich bekannt sind.

Herbizidlösungen können in herkömmlicher Weise angewendet werden, beispielsweise durch Besprühen, Lagieren oder Zerstäuben.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Ausführungsbeispiele

Experimentelles

Material und Methoden

Restriktionsenzyme und T4-Ligasen für Verknüpfungen wurden gemäß den Empfehlungen der Hersteller verwendet. Standardmethoden beim Klonen und der Molekularanalyse wurden gemäß Maniatis et al. „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982) durchgeführt. Die Klonanalyse wurde gemäß Ish-Horowitz et al. „Nucl. Acids Res.“, 9, S. 2989 bis 2998 (1981) durchgeführt.

Für alle Klonierungsversuche wurde der Stamm E. coli MM 294 verwendet (Hanahan, „Mol. Biol.“, 166, S. 557 bis 580 [1983]). Folgende Antibiotikamengen wurden eingesetzt: Chloramphenicol (Cm): 25 µg/ml; Tetracyclin (Tc): 10 µg/ml; Penicillin (Ap): 300 µg/ml.

Die Plasmid-DNA-Transformationen in E. coli wurden gemäß Mandel und Higa, „J. Mol. Biol.“, 53, S. 159 bis 162 (1970) durchgeführt.

Bakterien aus einem mit Bromoxynil verseuchten Boden wurden isoliert und selektioniert. Einer dieser Organismen wurde als *Klebsiella pneumoniae* Unterart *ozaenae* identifiziert.

Die Teilreinigung und Charakterisierung der bromoxynilspezifischen Nitrilase aus diesem Organismus ergab ein aktives Enzym mit einer Scheinmolekularmasse von 34 kDal.

Nach wiederholter Kultivierung von *K. ozaenae* auf festem L-Agar wurde eine Variante isoliert, die nicht mehr fähig war, Bromoxynil als einzige Stickstoffquelle zu verwenden, wenn sie in einem definierten flüssigen Medium gezüchtet wurde, das je Liter 1,5 g KH_2PO_4 , 3,5 g K_2HPO_4 , 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg Hefeextrakt, je 0,1 % Citrat, Glycerin und Succinat und Spurenelemente enthielt (vgl. Barnett und Ingraham, „J. Appl. Bacteriol.“, 18, S. 131 bis 143 [1975]). Dieses Medium wird im folgenden als

YETE-Mehrfachkohlenstoffmedium bezeichnet. Dieses YETE-Mehrfachkohlenstoffmedium enthielt 0,05 % Bromoxynil. Obwohl dieser Organismus Bromoxynil nicht als einzige Stickstoffquelle verwendet, wächst er in 0,05 % Bromoxynil enthaltender L-Brühe zur vollen Dichte. Eine Kolonie der *K. ozaenae*-Variante wurde ausgewählt und in 10 ml L-Brühe gezüchtet. Drei unabhängige *K. ozaenae*-Kolonien wurden von einer Bromoxynil enthaltenden LB-Platte ausgewählt und unter den gleichen Bedingungen gezüchtet. Diese vier gleichen *K. ozaenae*-Kolonien wurden gleichzeitig in 10 ml 0,05 % Bromoxynil enthaltender L-Brühe gezüchtet. Diese Kulturen wurden bei 30°C bis zur vollen Dichte gezüchtet, aus jeder Kultur wurde gemäß Ish-Horowitz et al. „Nucl. Acids Res.“, 9, S. 2989 (1981) Plasmid-DNA im Minimaßstab hergestellt. Nicht verdaute Plasmid-DNA wurde auf 0,5 % Agarosegel der Elektrophorese unterworfen, die Plasmid-Streifen wurden durch Färben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die *K. ozaenae*-Variante zeigte eine einzige Plasmidart (mit einer Größe von 68 KB), die entweder in Anwesenheit oder Abwesenheit von Bromoxynil entstand. Die drei *K. ozaenae*-Kolonien zeigten eine größere Plasmidart (90 KB) wenn sie in Gegenwart von 0,05 % Bromoxynil gezüchtet wurden. In Abwesenheit von Bromoxynil sind beide Plasmidformen in zwei der drei *K. ozaenae*-Kolonien vorhanden.

Diese Ergebnisse deuten auf die Umwandlung der größeren Plasmidart in eine kleinere Form, wobei gleichzeitig eine Plasmid-DNA mit etwa 22 KB verlorengeht, wenn die Bromoxynil-Selektion aufgehoben wird.

Alle vier Kolonien wurden in 200 ml 0,05 % Bromoxynil enthaltender L-Brühe gezüchtet. Die Zellen wurden mit einer französischen Presse aufgebrochen, die Hochgeschwindigkeits-Überstände wurden gegen einen Puffer, der 0,05 mol/l K_2HPO_4 , pH 7,5 und 2,5 mmol/l Dithiothreitol (DTT) enthielt, dialysiert. Die einzelnen Rohextrakte wurden auf Bromoxynil-spezifische Nitrilaseaktivität untersucht. Ein Rohextrakt aus der *K. ozaenae*-Variante enthielt keine nachweisbare Nitrilaseaktivität, während die anderen *K. ozaenae*-Rohextrakte spezifische Nitrilaseaktivitäten von 0,124, 0,105 bzw. 0,143 $\mu\text{mol NH}_3/\text{min}/\text{mg}$ Protein aufwiesen. 200 ml Zellen wurden bei 30°C bis zur mittleren Log-Phase in M9-Medium, das 0,1 % Glucose und 0,04 % Bromoxynil enthielt, gezüchtet (Miller „Experiments in Molecular Genetics“, Cold Spring Harbor Laboratory [1972]). Durch Aufbrechen der Zellen, Ultrazentrifugieren und Dialyse des Überstands im Puffer mit 0,05 mol/l K_2HPO_4 , pH 7,5 und 2,5 mmol/l DTT wurden Rohextrakte hergestellt. Die Substratkonzentration betrug in allen Versuchen 3 mmol/l Bromoxynil. Die Freisetzung von NH_3 wurde gemäß Harper „Biochem. J.“, 167, S. 685–692 (1977) überwacht. Die Fähigkeit der *K. ozaenae*-Variante, in Bromoxynil enthaltender L-Brühe zu wachsen, kann auf einer erworbenen Undurchlässigkeit des Organismus für die Verbindung beruhen. Der Organismus kann jedoch in bestimmten Medien unter Verwendung von Bromoxynil als einzige Stickstoffquelle nicht wachsen.

Zusammenfassend scheint die *K. ozaenae*-Nitrilase im Plasmid codiert zu sein. Das (die) das Enzym codierende(n) Gen(e) scheint (scheinen) auf einem 22 KB-Plasmid-DNA-Segment zu liegen, das spontan aus dem *K. ozaenae*-Plasmid in Abwesenheit der Bromoxynil-Selektion verlorengeht.

Die Bromoxynil-spezifische Nitrilase aus *K. ozaenae* wird in *E. coli* exprimiert.

Es wurde Plasmid-DNA aus *K. ozaenae*, die unter 0,5 % Bromoxynil-Selektion gezüchtet wurden, hergestellt und in *E. coli* MM 294 (thi, gyrA96, endI⁻, hsdR17) transformiert.

Die Transformanten wurden auf stickstofffreiem (N^-) festem Agarose-Minimalmedium, das je Liter 1,5 g KH_2PO_4 , 3,5 g K_2HPO_4 , 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,1 % Glucose sowie 0,05 % Bromoxynil als einzige Stickstoffquelle enthielt, selektioniert. Nach 5-tägiger Inkubation erschienen 10 Kolonien auf den Selektionsplatten. Diese Kolonien wurden auf 0,05 % Bromoxynil enthaltenden L-Agarplatten ausgestrichen und auf die Anwesenheit des auxotrophen Thiamin-Markers in MM 294 untersucht. Keine der Kolonien wuchs in Minimalmedia in Abwesenheit von Thiamin, das angibt, daß der Stamm *E. coli* MM 294 ist. Alle Kolonien wuchsen im M9-Medium, das mit Thiamin und 0,05 % Bromoxynil als einzige Stickstoffquelle versetzt wurde. Kein Wachstum wurde in diesem Medium in Abwesenheit von Bromoxynil beobachtet. Zwei der Kolonien wurden für weitere Analysen ausgewählt. Wurden Rohextrakte von *E. coli* MM 294, das das 90 KB-Plasmid enthielt, auf Bromoxynil spezifische Nitrilaseaktivität untersucht, so wurde eine spezifische Aktivität von 0,216 μmol freigesetztem $\text{NH}_3/\text{min}/\text{mg}$ festgestellt. In *E. coli* MM 294, das die kleinere Plasmidart enthielt, konnte keine Nitrilaseaktivität nachgewiesen werden. Das größere 90 KB Plasmid in *E. coli* wurde mit pBrx1, das kleinere Plasmid (68 KB) mit pBrx1 Δ bezeichnet.

Zur Bestätigung, daß der *E. coli*-Stamm MM 294, der das Plasmid pBrx1 enthält, den richtigen Metaboliten als Ergebnis einer Bromoxynil spezifischen Nitrilasereaktion produziert, wurde eine 2 ml-MM 294-Kultur (pBrx1) 24 h bei 30°C in 0,05 % Bromoxynil enthaltendem M9-Medium gezüchtet. Eine Probe des Kulturfiltrats wurde auf einer C_{18} -Hochdruck-Flüssigchromatographiesäule chromatographiert. Die Gesamtmenge an im Kulturfiltrat vorhandenem Bromoxynil wurde zu einem neuen Metabolitgipfel umgewandelt. Der Metabolitgipfel wurde durch Spektralanalyse als 3',5'-Dibrom-4-hydroxybenzoesäure (DBHB) identifiziert. Das heißt, das Produkt der Bromoxynil spezifischen, plasmidcodierten Nitrilaseexpression in *E. coli* ist das gleiche wie das von *K. ozaenae*.

Das Bromoxynil spezifische Nitrilasegen wird in *E. coli* kloniert.

Um festzustellen, ob daß das Bromoxynil spezifische Enzym codierende DNA-Segment in *E. coli* klonierbar ist, wurde das Plasmid pBrx1 mit BamHI gespalten, wobei zwei Streifen mit 53 KB bzw. 37 KB erhalten wurden. Die BamHI-Fragmente wurden in die BamHI-Stelle des *E. coli*-Plasmidvektors pACYC 184 eingebunden (Chang und Cohen, „J. Bacteriol.“ 134, S. 1141 [1978]) und in *E. coli* MM 294 transformiert. Das Klonel von pACYC 184 in der BamHI-Stelle führt zu einer Einschub-Inaktivierung des Tetracyclin-Resistenzgens. 10 chloramphenicolresistente, tetracyclinempfindliche MM 294-Kolonien wurden ausgewählt, im Minimaßstab eine Klonanalyse-DNA hergestellt und mit BamHI gespalten. Vier Klone enthielten das 37 KB-BamHI-Fragmente, während ein Klon das größere 53 KB-BamHI-DNA-Fragment von pBrx1 aufwies. Fünf Klone enthielten ein geklonetes BamHI-Fragment, das auch im Plasmid pBrx1 Δ gefunden wurde und dem DNA-Segment entspricht, das nach der spontanen Deletion des 22 KB-Segments der Plasmid-DNA aus pBrx1 zurückbleibt. Alle 10 Klone wurden in 200 ml L-Brühe in Anwesenheit von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol (zur Selektion des Plasmids) gezüchtet, die erhaltenen Rohextrakte wurden auf Bromoxynil

spezifische Nitrilaseaktivität untersucht. Vier Klone, die das 37 KB-BamHI-Fragment enthielten, zeigten spezifische Nitrilaseaktivitäten im Bereich von 0,140 μmol freigesetztem $\text{NH}_3/\text{min}/\text{mg}$ Protein, wogegen in den anderen sechs Klonen keine Nitrilaseaktivität nachweisbar war. Diese Ergebnisse zeigen, daß sich das eine Bromoxynil spezifische Nitrilaseaktivität codierende Gen auf einem 37 KB-BamHI-Fragment befindet, das aus dem Plasmid pBrx 1 geklont wird, und daß das 22KB-DNA-Segment, das spontan in Abwesenheit der Bromoxynilselektion verlorengeht, zu dem 37 KB-BamHI-Fragment gehört. Um die Orientierung der BamHI-Fragmente in bezug auf den Vektor pACYC 184 zu bestätigen, wurde die DNA aus den oben angegebenen vier Klonen mit EcoRI gespalten und der Elektrophorese auf einem 0,07%igen Agarosegel unterworfen. Ein kombiniertes EcoRI-Abbauprodukt der Plasmide pBrx 1 und pBrx1 Δ wurde ebenfalls untersucht. Beide Orientierungen des 37 KB-BamHI-Fragments in bezug auf den Vektor pACYC 184 wurden bestimmt und als Plasmide pBrx 2 und pBrx3 bezeichnet. Es wurde auch festgestellt, daß die drei EcoRI-Fragmente zu dem 22KB-DNA-Segment gehören, das spontan aus den Plasmiden pBrx2 und pBrx3 abgespalten wird. Diese EcoRI-Fragmente haben eine Größe von 18KB, 3KB bzw. 1,9KB. Das die Bromoxynil spezifische Nitrilase codierende Gen sollte sich innerhalb eines dieser drei EcoRI-Fragmente befinden, wenn das Nitrilase-Strukturgen nicht durch eine EcoRI-Restriktionsstelle geteilt ist. Die Lokalisierung der Bromoxynil spezifischen Nitrilase von E. coli (pBrx3) wurde untersucht, es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

Tabelle 1
Die Bromoxynil spezifische Nitrilase ist ein periplasmisches Enzym in E. coli

Kulturbedingungen ^a	Spezifische Nitrilaseaktivität ^b
mit Toluol behandelte Zellen (L-Brühe)	0,829
mit Lysozym behandelte Zellen (L-Brühe)	0,798
Gesamtzellen (L-Brühe)	0,770
Gesamtzellen (L-Brühe + Brx1)	1,25
Gesamtzellen (M9)	0,950
Gesamtzellen (M9 + Brx1)	1,45
Gesamtzellen/pACYC184 (M9)	0

^a E. coli (MM294)-Zellen, die das Plasmid pBrx3 enthielten, wurden in 5ml-Kulturen bei 37°C in dem angegebenen Medium bis zur stationären Phase gezüchtet. Die Kulturen enthielten, wo angegeben, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol und 0,04% Bromoxynil (Brx1). 1 ml jeder Kultur wurde gesammelt, einmal mit Nitrilasepuffer (0,1 mol/l K_2HPO_4 , pH 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden in 0,1 ml dieses Puffers wieder suspendiert. 50 μl -Proben wurden gemäß Harper „Biochem. J.“, 167, S. 685 bis 692 (1977) mit und ohne 3 mmol/l Bromoxynil als Substrat auf Nitrilaseaktivität untersucht.

^b μmol $\text{NH}_3/\text{min}/\text{mg}$. Das Protein wurde als $\text{OD}_{600} = 1,4 = 10^9$ Zellen/ml = 150 μg bestimmt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sich die Nitrilase im periplasmatischen Raum der Zelle befindet. Eine zweite Beobachtung ist, daß das Enzym in Abwesenheit von Bromoxynil im Medium exprimiert wird, was darauf hindeutet, daß die Bromoxynil Induktion für die Enzymexpression nicht notwendig ist.

Weitere Reinigung der Bromoxynil spezifischen Nitrilase

Die weitere Reinigung der K. ozeanae-Nitrilase wurde mit folgenden Ergebnissen durchgeführt:

Tabelle 2
Reinigung der Bromoxynil spezifischen Nitrilase von E. coli
(Ausgangsmaterial: 6g Zellen)

Fraktion	Volumen	Protein	μmol NH_3/min	S.A. ^b
Roh ^a	100 ml	210 ml	18,15	0,086
35-50 % NH_4SO_4	6 ml	83 mg	26,77	0,250
DEAE-Sephadex	56 ml	19 mg	15,52	0,820

^a Die Zellen wurden bei 30°C bis zur mittleren Log-Phase in M9-Medium, das 0,04% Bromoxynil und Glucose enthielt, gezüchtet. Die Rohextrakte wurden durch Aufbrechen der Zellen, Ultrazentrifugieren und Dialyse in einem Puffer, der 0,05 mol/l K_2HPO_4 , pH 7,5, und 2,5 mmol/l DTT enthielt, hergestellt. Die Substratkonzentration betrug bei allen Nitrilaseversuchen 3 mmol/l.

^b μmol $\text{NH}_3/\text{min}/\text{ng}$.

Eine 2,5 cm² × 10 cm große Säule wurde mit Puffer, der 0,05% K_2HPO_4 , pH 7,5, 2,5 mmol/l DTT und 1 mmol/l EDTA enthielt, equilibriert. Die Probe wurde aufgebracht, die Säule wurde 300 ml eines linearen Gradienten von 0,02 bis 0,40 mol/l NaCl im oben angegebenen Säulenpuffer entwickelt. 1 mol/l NaCl enthaltender Puffer wurde am Ende des Gradienten aufgegeben. Es wurden 5 ml-Fractionen gesammelt, 0,075 ml-Proben verschiedener Fractionen wurden auf Nitrilaseaktivität untersucht. Ein einziger Gipfel mit Enzymaktivität wurde bei 0,22 mol/l Salz eluiert. Etwa 75% der aufgegebenen Nitrilaseaktivität wurden in den aktiven Fractionen wiedergewonnen.

Die Fraktionen, die dem Nitrilasegipfel aus der DEAE-Säule entsprachen, wurden gegen 0,02 mol/l K_2HPO_4 , pH 7,5 dialysiert; 50 µl (6 µg Protein) jeder Fraktion wurden auf 11,25%iges denaturiertes Laemmli-Gel aufgegeben. Die mit Protein angereicherte Bande, die dem Aktivitätsgipfel aus der DEAE-Säule entspricht, ist ein Polypeptid mit einer Molekülmasse von 34000. Es wurden keine anderen Polypeptide in den aktiven Säulenfraktionen angereichert. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Bromoxynil spezifische Nitrilase ein Polypeptid mit einer Molekülmasse von etwa 34000 ist, das vermutlich das Produkt eines einzigen Gens ist.

Der pBrx2-Klon wurde vollständig mit EcoRI gespalten, dabei wurde ein Fragment von etwa 19KB isoliert. Das Fragment wurde in den EcoRI-abgebauten pACYC 184-Vektor (3,9KB) zu dem Plasmid pBrx5 eingebaut, das wie oben beschrieben in E.coli transformiert wurde. Das Plasmid wurde in herkömmlicher Weise isoliert und mit BglII zu einem Fragment mit etwa 6,7 KB abgebaut, das in dem Vektor pACYC 184 bleibt.

Das isolierte Plasmid pBrx7 wurde mit SmaI und BglII zu einem Fragment mit etwa 3,9KB verdaut, das in SmaI-BamHI-abgebautes pACYC 177 (3,7KB) eingebaut wurde (Chang und Cohen, „J. Bacteriol.“, 134, S. 1141 bis 1156 [1978]). Das entstandene Plasmid, das Penicillinresistenz verleiht, wurde in E.coli wie oben beschrieben transformiert; die Transformanten wurden auf einem penicillinselektiven Medium zu einem Plasmid pBrx8 selektioniert, daß das Nitrilasegen auf einem 3,9KB-Fragment trägt.

pBrx8 wurde mit PstI teilabgebaut, die Fragmente wurden in PstI-verdaulichem pUC 18 eingebaut (Yanisch-Perron et al., „Gene“, 33, S. 103–119 [1985]). Die entstandenen Plasmide wurden in E.coli kloniert und auf Nitrilaseaktivität untersucht. Ein Klon wies ein 5,3 KB-Plasmid pBrx9 auf, das isoliert und mit PstI und HincII weitergespalten wurde, wobei ein Fragment mit 1210 BP entstand, das in Richtung von PstI zu HincII, ClaI, SalI, ScaI und SphI-Restriktionsstellen in relativ gleichmäßigen Abständen hat. Das PstI-HincII-Fragment wurde gemäß Sanger et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 74, S. 5463–5468 [1977]) sequenziert. Die Sequenz (mit den entsprechenden codierten Aminosäuren) ist im folgenden angegeben:

65

CTGCAGGATAGTAGGGGCTTGAAGAGGATACGCTGTTTGGCGAGCCATCAAATAAGGGGATTTTC

95 125

ATG GAC ACC ACT TTC AAA GCA GCC GCT GTT CAG GCC GAA CCG GTA TGG ATG GAT GCC GCT
Met Asp Thr Thr Phe Lys Ala Ala Ala Val Gln Ala Glu Pro Val Trp Met Asp Ala Ala

155 185

GCA ACA GCC GAT AAG ACC GTG ACG CTA GTA GCT AAA GCC GCA GCG GCT GGC GCG CAG CTC
Ala Thr Ala Asp Lys Thr Val Thr Leu Val Ala Lys Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gln Leu

215 245

GTC GCA TTT CCC GAA TTG TGG ATT CCG GGC TAC CCA GGA TTC ATG CTC ACG CAC AAC CAA
Val Ala Phe Pro Glu Leu Trp Ile Pro Gly Try Pro Gly Phe Met Leu Thr His Asn Gln

275 305

ACC GAA ACC CTA CCA TTC ATC ATT AAA TAC CGC AAG CAG GCA ATC GCC GCC GAT GGA CCA
Thr Glu Thr Leu Pro Phe Ile Ile Lys Try Arg Lys Gln Ala Ile Ala Ala Asp Gly Pro

335 365

GAA ATC GAA AAA ATT CGC TGC GCG GCT CAG GAG CAT AAC ATT GCG CTC TCC TTT GGG TAC
Glu Ile Glu Lys Ile Arg Cys Ala Ala Gln Glu His Asn Ile Ala Leu Ser Phe Gly Tyr

395 425

AGC GAA CCG GCT GGC CGT ACT CTC TAC ATG TCA CAA ATG CTT ATC GAT GCC GAT GGC ATC
Ser Glu Arg Ala Gly Arg Thr Leu Tyr Met Ser Gln Met Leu Ile Asp Ala Asp Gly Ile

455 485

ACC AAA ATT CGT CGT CGA AAG CTC AAA CCA ACC CGC TTT GAA CGA GAA CTC TTT GGC GAA
Thr Lys Ile Arg Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr Arg Phe Glu Arg Glu Leu Phe Gly Glu

515 545

GGT GAC GGA TCG GAC TTA CAG GTC GCC CAA ACT AGC GTT GGT CCG GTG GGT GCC CTC AAC
Gly Asp Gly Ser Asp Leu Gln Val Ala Gln Thr Ser Val Gly Arg Val Gly Ala Leu Asn

575 605

TGC GCG GAG AAT TTG CAG TCG CTA AAC AAC TTT GCG CTT GCT CCG GAG GGT GAA CAG ATA
Cys Ala Glu Asn Leu Gln Ser Leu Asn Lys Phe Ala Leu Ala Ala Glu Gly Glu Gln Ile

```

                                635                                665
CAT ATC TCC GCC TGG CCA TTC ACG CTT GGA AGC CCT GTG CTC GTC GGA GAC TCC ATC GGC
His Ile Ser Ala Trp Pro Phe Thr Leu Gly Ser Pro Val Leu Val Gly Asp Ser Ile Gly

                                695                                725
GCC ATC AAC CAG GTC TAC GCG GCC GAG ACG GGG ACC TTC GTT CTC ATG TCG ACG CAG GTG
Ala Ile Asn Gln Val Tyr Ala Ala Glu Thr Gly Thr Phe Val Leu Met Ser Thr Gln Val

                                755                                785
GTT GGA CCG ACC GGC ATC GCC GCC TTC GAG ATC GAA GAC AGG TAC AAC CCG AAT CAG TAT
Val Gly Pro Thr Gly Ile Ala Ala Phe Glu Ile Glu Asp Arg Tyr Asn Pro Asn Gln Tyr

                                815                                845
CTT GGT GGT GGG TAC GCG CCG ATC TAC GGG CCT GAC ATG CAG TTG AAG AGC AAG TCG TTG
Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp Met Gln Leu Lys Ser Lys Ser Leu

                                875                                905
TCA CCG ACC GAA GAG GGC ATC GTC TAC GCC GAG ATC GAC CTG TCG ATG CTT GAG GCA GCA
Ser Pro Thr Glu Glu Gly Ile Val Tyr Ala Glu Ile Asp Leu Ser Met Leu Glu Ala Ala

                                935                                965
AAG TAC TCG CTC GAT CCC ACG GGC CAC TAT TCG CGC CCT GAT GTG TTC AGC GTG TCG ATT
Lys Tyr Ser Leu Asp Pro Thr Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Phe Ser Val Ser Ile

                                995                                1025
AAC CGG CAA CGG CAG CCT GCG GTG TCA GAA CTT ATC GAC TCA AAC GGT GAC GAG GAC CCG
Asn Arg Gln Arg Gln Pro Ala Val Ser Glu Val Ile Asp Ser Asn Gly Asp Glu Asp Pro

                                1055                                1085
AGA GCA GCA TGC GAG CCC GAC GAG GGG GAT CGT GAG GTC GTA ATC TCT ACG GCA ATA GGG
Arg Ala Ala Cys Glu Pro Asp Glu Gly Asp Arg Glu Val Val Ile Ser Thr Ala Ile Gly

                                1115                                1155
GTT CTA CCC CGT TAT TGC GGA CAT TCC TAAATAAAAGAGACACGTGGTACCAAAGGGGTGTTTCATGTCCA
Val Leu Pro Arg Tyr Cys Gly His Ser

                                1200
GACGCAGAAAATATAGCCCAGAGTTAAACGCGAAGCCATCGCTTTAACCCGTCAAC

```

Das von den nicht codierenden flankierenden Regionen am 5'- und am 3'-Ende praktisch freie PstI-HincII-Fragment kann mit EcoRI-Linkern verknüpft und mit EcoRI gespalten werden und ist dann fertig, um in eine Pflanzenexpressionskassette durch Einschub in die EcoRI-Stelle von pCGN451 eingeführt zu werden.

pCGN451 umfaßt eine Octopin-Kassette, die etwa 1566BP der 5'-nichtcodierenden Region, die über einen EcoRI-Linker an das 3'-Ende des Gens gebunden ist, und etwa 1349BP der 3'-nichtcodierenden DNA enthält. Die pTi-Koordinaten sind 11.207 bis 12.823 für die 3'-Region und 13.643 bis 15.208 für die 5'-Region (definiert gemäß Barker et al. „Plant Molecular Biology“, 2, S.335 [1983]).

Das 5'-Fragment wurde wie folgt erhalten: ein kleines unterkloniertes Fragment, daß das 5'-Ende der codierenden Region als BamHI-EcoRI-Fragment enthält, wurde in pBR322 als Plasmid pCGN407 geklont. Das BamHI-EcoRI-Fragment hatte eine XmnI-Stelle in der codierenden Region, während pBR322 zwei XmnI-Stellen aufwies. pCGN407 wurde mit XmnI abgebaut, mit Bal31-Nuklease gespalten. Den Fragmenten wurden EcoRI-Linker zugegeben. Nach dem Abbau mit EcoRI und BamHI wurden die Fragmente nach Größe fraktioniert, die Fraktionen geklont und sequenziert. In einem Fall wurde die ganze codierende Region und 10BP der 5'-nichtübersetzten Sequenzen entfernt, wobei die 5'-nichttranskribierte Region, die mRNA-Kappenstelle und 16BP der 5'-nichtübersetzten Region (zu einer BamHI-Stelle) intakt zurückblieben. Dieses kleine Fragment wurde durch Größenfraktionierung auf einem 7%igen Acrylamidgel erhalten, etwa 130BP lange Fragmente wurden eluiert. Diese nach Größe fraktionierte DNA wurde in M13mp9 eingebunden; verschiedene Klone wurden sequenziert, die Sequenz wurde mit der bekannten Sequenz des Octopin-Synthase-Gens verglichen. Die M13-Konstruktion wurde mit p14 bezeichnet, dieses Plasmid wurde mit BamHI und EcoRI zu einem kleinen Fragment gespalten, das an ein XhoI-BamHI-Fragment, das stromaufwärts

5'-Sequenzen von pTiA6 (Garfinkel und Nester, „J. Bacteriol.“, 144, S. 732 [1980]) enthielt, und an ein EcoRI-XhoI-Fragment, das 3'-Sequenzen enthielt, gebunden. Das entstandene XhoI-Fragment wurde in die XhoI-Stelle eines pUC8-Derivats mit der Bezeichnung pCGN426 geklont. Dieses Plasmid unterscheidet sich von pUC8 dadurch, daß die einzige EcoRI-Stelle mit DNA-Polymerase I gefüllt ist und dadurch, daß es die PstI- und HindIII-Stelle durch Nukleaseverunreinigung der HincII-Restriktionsendonuklease verloren hat, wenn ein XhoI-Linker in die einzige HincII-Stelle von pUC8 eingebaut wird. Das entstandene Plasmid pCGN451 hat eine einzige EcoRI-Stelle für den Einbau von Protein-codierenden Sequenzen zwischen der 5'-nichtcodierenden Region (die 1550 BP der 5'-nichttranskribierten Sequenz einschließlich des rechten Randes von T-DNA, die mRNA-Kappenstelle und 16 BP der 5'-nichtübersetzten Sequenz enthält) und der 3'-Region (die 267 BP der codierenden Region, das Stopcodon, 196 BP der 3'-nichtübersetzten DNA, die PolyA-Stelle und 1153 BP der 3'-nichttranskribierten Sequenz enthält). Das XhoI-Fragment, das die Octopin-Synthase (ocs)-Kassette enthält, wurde in das Plasmid pCGN517 eingebaut, das Tetracyclin- und Kanamycin-Resistenzgene aufweist.

pCGN517 wurde aus pHC79 (Hohn, „Gene“, 11, S. 291 [1980]) durch Einführung in die einzige PstI-Stelle des Kan'-Gens aus pUC4K (Vieira, „Gene“, 19, S. 259 [1982]) hergestellt. pCGN517 wurde mit SalI abgebaut, das XhoI-Fragment wurde in die einzige SalI-Stelle eingebaut.

Das XhoI-Fragment wurde auch in ein zweites Plasmid pCGN529 eingebaut. pCGN529 wurde aus pACYC184 durch Einbau des Kan'-Gens aus Tn5 hergestellt (Rothstein et al., „Movable Genetic Elements“, S. 99, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1981). Ein BglII-Fragment mit einer Größe von 2,4 KB aus pRiA4-T₁-DNA (White und Nester, „J. Bacteriol.“, 144, S. 710 [1980]), das in die BamHI-Stelle eingeführt wurde, blieb nach der Substitution des HindIII-BamHI-Fragments von pACYC184 mit dem Kan'-Gen von Tn5 zurück.

Das XhoI-Fragment, das die ocs-Kassette enthält, in die das EcoRI-Nitrilasegen an der einzigen EcoRI-Stelle der ocs-Kassette eingebaut ist, wurde in pCGN517 und pCGN529 eingebaut. Dabei wurden zwei Plasmide pN1 bzw. pN2 erhalten, die für die Einführung in *A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes* zur Integration der T-DNA der Ti- oder Ri-Plasmide verwendet wurden. Die Integration in die entsprechenden Plasmide kann in einem 3-Stufen-Verfahren gemäß Comai et al., „Plasmid“, 10, S. 21-30 (1983) durchgeführt werden. Übernachtskulturen eines *E. coli*-Wirts, der die Plasmide pRK2073, pN1 oder pN2 und *A. tumefaciens* A722 (Garfinkel, „J. Bacteriol.“, 144, S. 732 [1980]) oder *A. rhizogenes* A4T (White, ibid., 144, 710 [1980]) enthielten, wurden über Nacht gezüchtet. Die Kulturen wurden vermischt und auf AB-Platten, die 150 µg/ml Kanamycin enthielten, ausgestrichen. Einzelne Kolonien wurden zweimal ausgestrichen. Die richtige Integration wurde durch die Southern-Analyse der Gesamt-Agrobacterium-DNA nachgeprüft. Endonuklease-abgebaute DNA wurde mit kerben-übersetztem (nick-translatet) pBrx8 untersucht.

Das Bromoxynil spezifische Nitrilasegen wird in Gallengewebe exprimiert.

Das Plasmid pBrx9, daß das Nitrilasegen auf einem 2,6 KB-Fragment trägt, wurde mit BamHI abgebaut und mit Bal31 zur Entfernung eines Teils der 5'-flankierenden Region behandelt. Es wurden BamHI-Linker zugegeben und der Ring wieder geschlossen. Die entstandenen Plasmide, die Ampicillinresistenz verleihen, wurden wie oben beschrieben in *E. coli* transformiert. Die Transformanten wurden auf einem Ampicillin-selektiven Medium zu den 5,2 KB-Plasmiden, pBrx16 bzw. pBrx17 selektioniert, die das Nitrilasegen auf einem 2,6 KB-Fragment tragen. pBrx16 wurde mit BamHI gespalten und mit HincII teilabgebaut, wobei ein 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment entstand.

Das BamHI-HincII-Fragment wurde in mit BamHI-SmaI abgebautem pCGN46 eingebaut, wobei das 6,6 KB-Plasmid pBrx22 entstand, daß das Nitrilasegen-Fragment enthält.

pCGN46 (Comai et al., „Nature“, 317, S. 741-744 [1985]) ist eine Mannopin-Synthase (MAS)-Expressionskassette und enthält einen MAS-Promotor und eine ocs-3'-Region. pCGN46 wurde wie folgt hergestellt: ein EcoRI-Fragment (Eco13 oder EcoC) mit etwa 5500 BP, das einen Teil der T₁-DNA (Barker et al., „Plant Mol. Biol.“, 2, S. 325 [1983]) einschließlich der Mannopin-Synthase-Promotorregion (P_{MAS}) trägt, wurde in einem mit pVK232 gezeichneten Vektor geklont. Nach Abbau von pVK232 mit EcoRI wurde Eco13 in die EcoRI-Stelle von pACYC184 zu einem Plasmid pCGN1 eingebaut. pCGN14 wurde mit SphI und ClaI (jeweils an Pos. 21562 und 20128 der Barker-Sequenz, w.o.) gespalten, um die P_{MAS}-Region zu entfernen, die in pUC19 (Pharmacia Inc.), das mit SphI und AccI abgebaut wurde, eingebaut. Es entstand pCGN40. Die P_{MAS}-Region umfaßt eine ClaI-Erkennungsstelle, die methyliert ist, um sie gegen den Abbau resistent zu machen.

pCGN40 wurde mit EcoRV und EcoRI gespalten, dort wo sich die EcoRV-Stelle in der T-DNA befindet, während die EcoRI-Stelle in dem Polylinker von pUC19 ist; dabei entsteht ein Fragment mit der P_{MAS}-Region. pCGN451, das die Octopin-Synthase-Kassette enthält, wurde mit SmaI und EcoRI abgebaut, das größere Fragment, aus dem die Octopin-Synthase-5'-Region entfernt worden ist, wurde isoliert. Die EcoRV-EcoRI-P_{MAS}-Region wurde in pCGN451 anstelle der Octopin-Synthase-5'-Region eingebaut, dort wo die Transkriptions-Startregion und die -Endregion durch einen Polylinker getrennt sind; es entsteht pCGN46.

Das Plasmid pBrx22, daß das 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment enthält, wurde, wie oben beschrieben, in *E. coli* transformiert. Das Plasmid wurde in herkömmlicher Weise isoliert und mit XhoI zu einem 4,1 KB-Fragment abgebaut, das den MAS-Promotor, das Bromoxynilgen mit 25 BP der bakteriellen 5'-nicht-übersetzten Sequenz und die ocs-3'-Region enthielt. Das 4,1 KB-Fragment wurde in das mit SalI abgebaute Plasmid pCGN783 eingeführt, dabei entstand das Plasmid pBrx28 mit etwa 31 KB.

Herstellung von pCGN783

Herstellung von pCGN167

Zur Herstellung von pCGN167 wurde das AluI-Fragment von CaMV (7144 bis 7735 BP, Gardner et al. „Nucl. Acids Res.“, 9, S. 2871-2888 [1981]) durch Abbau mit AluI erhalten und in die HincII-Stelle von M13mp7 (Vieira, „Gene“, 19, S. 259 [1982]) zu C614 geklont. Durch EcoRI-Abbau von C614 wurde das EcoRI-Fragment von C614 erhalten, das das 35S-Promotor enthielt, der in die EcoRI-Stelle von pUC8 (Vieira et al., „Gene“, 19, S. 259 [1982]) zu pCGN146 geklont wurde.

Um die Promotorregion zu trimmen, wurde die BglII-Stelle (7670 BP) mit BglII und Bal31 behandelt; dann wurde ein BglII-Linker an die mit Bal31 behandelte DNA zur Herstellung von pCGN147 gebunden.

pCGN148a, das eine Promotorregion, einen selektionierbaren Marker (KAN) mit 2ATG und eine 3'-Region enthielt, wurde durch Abbau von pCGN528 (s.u.) mit BglII und Einführen des BamHI-BglII-Promotor-Fragments aus pCGN147 hergestellt. Dieses Fragment wurde in die BglII-Stelle von pCGN528 geklont, so daß die BglII-Stelle in der Nähe des Kanamycingens von pCGN528 ist.

Der für diese Konstruktion verwendete Pendelvektor (shuttle vector) pCGN 528, wurde wie folgt hergestellt: pCGN 525 wurde durch Abbau eines Plasmids, das Tn5 mit einem Kanamycingen (Jorgenson et al., „Mol. Gen.“, 177, S. 65 [1979]) enthält, mit HindIII-BamHI und Einführen des HindIII-BamHI-Fragments, das das Kanamycingen enthält, in die HindIII-BamHI-Stellen des Tetracyclingens von pACYC 184 (Chang und Cohen, „J. Bacteriol.“, 134, S. 1141–1156 [1978]) hergestellt.

pCGN 526 wurde durch Einführen des BamHI-Fragments 19 von pTiA6 (Thomashow et al., „Cell“, 19, S. 729–739 [1980]) in die BamHI-Stelle von pCGN 525 hergestellt.

pCGN 528 wurde durch Entfernen des kleinen XhoI-Fragments aus pCGN 526 durch Abbau mit XhoI und Wiederverknüpfen erhalten.

pCGN 149a wurde durch Klonen des BamHI-Kanamycingen-Fragments aus pMB9KanXXI in die BamHI-Stelle von pCGN 148a hergestellt.

pMB9KanXXI ist eine pUC4K-Variante (Vieira und Messing, „Gene“, 19, S. 259–268 [1982]), der die XhoI-Stelle fehlt, die jedoch ein funktionelles Kanamycingen aus Tn903 enthält, das eine wirkungsvolle Selektion in Agrobacterium ermöglicht.

pCGN 149a wurde mit BglII und SphI abgebaut. Dieses kleine BglII-SphI-Fragment von pCGN 149a wurde durch das BamHI-SphI-Fragment aus M 1 (siehe unten) ersetzt, das durch Abbau mit BamHI und SphI isoliert wurde. Dabei entsteht pCGN 167, eine Konstruktion, die einen CaMV-Promotor mit voller Länge, 1-ATG-Kanamycingen, das 3'-Ende und das bakterielle Tn903-Kanamycingen enthält.

M 1 ist ein EcoRI-Fragment aus pCGN 550 (siehe Herstellung von pCGN 587), das in die EcoRI-Klonierstelle von M 13mp9 so geklont wurde, daß die PstI-Stelle in dem 1-ATG-Kanamycingen in der Nähe der Polylinkerregion von M 13mp9 ist.

Herstellung der 709 (1-ATG-Kanamycin-3'-Region)

pCGN 566 enthält den EcoRI-HindIII-Linker von pUC 18 (Yanisch-Perron, *ibid*), der in die EcoRI-HindIII-Stellen von pUC 13-cm eingeführt wurde (K. Buckley, Dissertation, UC-San Diego, 1985). Das HindIII-BglII-Fragment von pNW31c-8, 29-1 (Thomashow et al., „Cell“, 19, S. 729 [1980]), das ORF 1 und 2 enthält (Barker et al., siehe oben [1983]), wurde in die HindIII-BamHI-Stelle von pCGN 566 zu pCGN 703 subkloniert.

Das Sau3A-Fragment von pCGN 703, das die 3'-Region des Transkripts 7 von pTiA6 enthält (entsprechend den Basen 2398–2920 von T 115955 (Barker et al., siehe oben [1983]), wurde in die BamHI-Stelle von pUC 18 (Yanisch-Perron et al., siehe oben, [1985]) zu pCGN 709 subkloniert.

Herstellung von pCGN 766c (35S-Promotor – 3'-Region)

Das HindIII-BamHI-Fragment von pCGN 167 (Herstellung siehe unten), das den CaMV-35S-Promotor, das 1-ATG-Kanamycingen und das BamHI-Fragment 19 von pTiA6 enthält, wurde in die BamHI-HindIII-Stellen von pUC 19 geklont (Norlander et al., siehe oben [1983]; Yanisch-Perron et al., siehe oben [1985]); es entstand pCGN 976.

Der 35S-Promotor und die 3'-Region aus dem Transkript 7 wurden durch Einführen eines 0,7 KB-HindIII-EcoRI-Fragments von pCGN 976 (35S-Promotor) und des 0,5 KB-EcoRI-Sall-Fragments von pCGN 709 (Transkript 7:3', Herstellung siehe oben) in die HindIII-Sall-Stellen von pCGN 566 hergestellt; es entstand pCGN 766c.

Endaufbau von pCGN 783

Das 0,7 KB-HindIII-EcoRI-Fragment von pCGN 766c (CaMV-35S-Promotor) wurde an das 1,5 KB-EcoRI-Sall-Fragment von pCGN 726c (1-ATG-KAN-3'-Region) in die HindIII-Sall-Stellen von pUC 119 (J. Vieira, Rutgers University, N.J.) gebunden; es entstand pCGN 778.

Die 2,2 KB-Region von pCGN 778, das HindIII-Sall-Fragment, das die CaMV-35S-Promotor (1-ATG-KAN-3'-Region) enthält, ersetzte die HindIII-Sall-Polylinkerregion von pCGN 739; es entstand pCGN 783.

pBrx 17 wurde mit BamHI abgebaut und mit HincII teilabgebaut, wodurch das 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment entstand. Das BamHI-HincII-Fragment wurde in mit BamHI-SmaI abgebautes pCGN 566 eingebaut, es entstand das 3,7 KB-Plasmid pBrx 25, das das Nitrilasegen-Fragment enthält.

pCGN 566 wurde wie folgt hergestellt: pUC 13 (Cm^R) (Ken Buckley, Dissertation, U.C., San Diego) wurde mit EcoRI und HindIII abgebaut, Polylinker aus pUC 18 und pUC 19 wurden jeweils in das lineargemachte pUC 13 eingebaut, wobei pCGN 566 entstand, das einen Chloramphenicolresistenzmarker trägt.

Das Plasmid pBrx 25, das das 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment enthält, wurde wie oben beschrieben in E. coli transformiert. Das Plasmid wurde in herkömmlicher Weise isoliert und mit BamHI und EcoRI wiederum zum 1,2 KB-Nitrilasegen-Fragment abgebaut. Das BamHI- und EcoRI-Fragment wurde in mit BamHI und EcoRI abgebautem pCGN 46 eingebaut, es entstand das 6,6 KB-Plasmid pBrx 27, das das Nitrilasegen-Fragment enthält.

pBrx 27 wurde wie oben beschrieben in E. coli transformiert. Das Plasmid wurde in herkömmlicher Weise isoliert und mit XhoI abgebaut, es entstand ein 4,1 KB-Fragment, das den MAS-Promotor, das Bromoxynilgen mit 11 BP der bakteriellen 5'-Region in der übersetzten Sequenz und die ocs-3'-Region enthält. Das 4,1 KB-Fragment wurde in mit Sall abgebautes pCGN 783 eingebaut, es entstand das Plasmid pBrx 29 mit etwa 31 KB.

Nachweis der Nitrilaseexpression

Die Plasmide pBrx 28 und pBrx 29 wurden in den Stamm Agrobacterium tumefaciens K 12 transformiert (Nester, „Ann. Rev. Micro.“, 35, S. 531 [1981]; Hoekema et al., „Nature“, 303, S. 179 [1983]). K 12 [pBrx 26] und K 12 [pBrx 29] wurden zur Bildung von Gallen auf Kalanchoe verwendet (Garfinkel, „J. Bacteriol.“, 144, S. 732 [1980]).

Etwa 1 g (Frischgewicht) Gallengewebe wurden in flüssigem Stickstoff und einem Puffer, der 0,1 mol/l Tris, pH 7,5, 10 mmol/l EDTA, 0,15 mol/l NaCl, 0,05% NP-40 (Netzmittel), 25 mg/ml BSA (Rinderserumalbumin), 1 mmol/l DTT und 0,13 µg/ml Leupeptin enthält, gemahlen. Die Proben wurden nach der Zugabe von 0,05 g Polyvinylpyrrolidon (Sigma) homogenisiert, dann bei 15000 g 15 min bei 4°C zentrifugiert. 25 µl Antiserum, das durch Injektion von gereinigter Nitrilase in Kaninchen hergestellt wurde, und 250 µl 10%ige (Masse/Volumen) Suspension von S. aureus (Calbiochem) wurden zu jedem Überstand zugegeben und 16 h bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden dann zentrifugiert, der Niederschlag wurde zweimal mit 20 mmol/l Tris, pH 7,5, 1 mmol/l EDTA, 150 mmol/l NaCl und 0,05% NP-40 gewaschen. Die Niederschläge wurden in 100 µl 0,125 mol/l Tris, pH 6,8, 4% SDS (Natriumdodecylsulfat), 20% Glycerin und 10% BME (β-Mercaptoethanol) wieder suspendiert und 2 min auf 90°C erhitzt. Alle Proben wurden auf 10%igem Acrylamidgel der Elektrophorese unterworfen (V.K. Laemmli „Nature“, 227, S. 680–685 [1970]). Die

wiederaufgelösten Polypeptide wurden auf Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schuell) transferiert (vgl. Burnette, „Anal. Biochem.“, 112, S. 195–203 [1981]). Die Nitrozellulosefilter (Schleicher & Schuell) wurden dann in BLOTTO (Johnson et al., „Gen. Anal. Technol.“, 1, S. 38–42 [1983]) 1 bis 3 h bei 42°C inkubiert, dann über Nacht bei Raumtemperatur in BLOTTO, das eine 1:50-Lösung des Anti-Nitrilaseserums enthielt, inkubiert. Die Filter wurden 10 min in 20 mmol/l Tris, pH 7,5 und 150 mmol/l NaCl, dann 20 min in dem gleichen Puffer, der jedoch 0,05% Tween-20 enthielt und weitere 10 min in dem Puffer ohne Tween-20 gewaschen. Es wurde dann BLOTTO, das 10⁶ cpm/ml ¹²⁵I-rnarkiertes Protein A (9 µCi/mg; NEN) enthielt, zu den Filtern zugegeben, die 2 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Filter wurden über Nacht in 50 mmol/l Tris, pH 7,5, 1 mol/l NaCl und 0,4% Sarkosyl gewaschen. Nach dem Spülen und dem Trocknen wurden die Filter einem Kodak AR-Röntgenfilm bei –70°C unter Verwendung eines DuPont-Cronex-Intensivierungsserums ausgesetzt.

Transformation und Regenerierung von Tabakblätter-Scheiben, die mit *A. tumefaciens* kokultiviert wurden

Tabakpflanzen wurden unter sterilen Bedingungen (25°C, 16 h weißes Licht, MS-Medium (1 mg/l IAA [Indoleessigsäure], 0,15 mg/l Kinetin) kultiviert. 3 Wochen alte Pflanzen, die durch Verpflanzungen des Haupttriebs erhalten wurden, werden als Gewebespende verwendet. Junge Blätter (bis zum vierten Blatt von oben) wurden ausgewählt, Blattscheiben mit einem Durchmesser von 2 mm wurden ausgestanzt und in Petrischalen (3 cm Durchmesser) in 1 ml MS-Medium mit 1 mg/l IAA eingebracht. Nachdem die Scheiben über Nacht in völliger Dunkelheit gehalten wurden, wurde *Agrobacterium* (A772xpN1 oder pN2)-Zellen (10⁸–10⁹/ml in Pflanzkulturmedium) diesen Kulturen zugegeben. Die Kokultivierung wurde 18 bis 24 h in der Dunkelheit durchgeführt. Durch dreimaliges Waschen mit MS-Medium ohne Hormone, das jedoch 350 mg/l Cefotaxin (Boehringer, Mannheim) enthielt, wurden die Blattscheiben von *Agrobacterium* befreit. Die Blattscheiben wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm in 10 ml MS-Medium ohne Hormone eingebracht. Petrischalen mit Phytagar (0,6% Gibco, 350 mg/l Cefotaxin) wurden mit Paraffin verschlossen und unter den gleichen Bedingungen als Gewebespendepflanzen gehalten. Die Regenerationskeime wurden in den folgenden 2 bis 5 Wochen sichtbar. Die Pflanzen mit 6 Blättern wurden mit einem direkten Strahl einer Bromoxynil-Lösung auf die eingetopfte Pflanze besprüht. Jeder 10-cm-Topf enthielt eine Pflanze und erhielt 2,5 ml Spray. Die Pflanzen wurden in einem Gewächshaus bei 25°C, 70% relativer Feuchtigkeit und einer Lichtperiode von 60 h gezüchtet. Das Wachstum wurde 9 Tage nach dem Besprühen durch Zählen der neuen Blätter, die länger als 0,5 cm waren, bestimmt.

Herstellung einer kleinen Untereinheit einer Promotor-Bromoxynilgen-Chimäre von Tabak zur Expression der Bromoxynil-spezifischen Nitrilase in Tabak

Herstellung einer Tabak-ssu-Promotorkassette

Genom-Klone, die die kleine Tabakgen-Untereinheit enthielten, wurden aus einer EcoRI-Teilgenombibliothek, die aus *Nicotiana tabacum* (Samsum)-DNA hergestellt wurde, isoliert. Die Klone wurden unter Verwendung eines PstI-DNA-Segments mit 740 BP eines Klon einer kleinen Erbsen-cDNA-Untereinheit ausgewählt (Broglie et al., „Proc. Natl. Acad. Sci. USA“, 78, S. 7304–7308 [1981]). Ein 3,4-KB-EcoRI-Fragment, das eine Tabak-codierende Region und eine 5'-flankierende Sequenz enthielt, wurde aus einem Charon-32-Lambda-Phasenklon (3–8) in M13mp18 geklont (Yanisch-Perron et al., „Gene“, 33, S. 103–119 [1985]). Dieser Unterklon wurde mit NSUE 2018 bezeichnet. Die Lokalisierung der TATA-Box (Promotor) und des mußmaßlichen ATG-Startcodons für das Protein der kleinen Untereinheit wurde durch DNA-Sequenzierung bestimmt. Eine einsträngige DNA-Schablone wurde aus NSUE 2018 hergestellt und zu einem Ring eines 25basigen einsträngigen synthetischen Oligomers (5'TGTTAATTACACTTAAGACAGAAA3') geschlossen. Diese Sequenz ist zu den 25 Basen unmittelbar am 5'-Ende des mußmaßlichen ATG der kleinen Tabakgen-Untereinheit komplementär. Der Primer wurde zur Herstellung von doppelsträngiger DNA unter Verwendung des Klenow-Fragments von DNA-Polymerase I erweitert, mit HindIII zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment mit einem stumpfen Ende an einem Ende des Primers und dem HindIII-Überhang am anderen Ende abgebaut. pUC19 wurde mit SmaI und HindIII abgebaut, das oben hergestellte doppelsträngige DNA-Fragment wurde in den Polylinker eingebaut, wobei ein 4,1 KB-Plasmid mit der Bezeichnung pCGN 625 entstand. pCGN 625 wurde mit HindIII abgebaut, mit dem Klenow-Fragment am stumpfen Ende verbunden, mit EcoRI abgebaut und in mit EcoRI-SmaI gespaltenes pUC 18 eingebaut; es entstand ein 4,1 KB-Plasmid pCGN 627. Ein 6,3 KB-DNA-Segment wurde erhalten, das ein BamHI-PstI-Fragment aus pACYC 177 (Chang und Cohen, „J. Bacteriol.“, 134, S. 1141–1156 [1978]) enthielt, das an der PstI-Stelle an ein PstI-EcoRI-Fragment gebunden ist, das die ocs-3'-Region, 12823 BP (EcoRI) bis 10069 BP (PstI) umfaßt (Barker et al., „Plant Molec. Biol.“, 2, S. 335–350 [1984]). Das 6,3 KB-DNA-Segment wurde in mit BamHI und EcoRI abgebautes pCGN 627 eingeführt, so daß die ocs-3'-Region zu dem Tabak-ssu-Fragment benachbart ist; es entstand ein 7,7 KB-Plasmid pCGN 630.

Das pCGN 630-Plasmid wurde durch Abbau mit BamHI, Verknüpfen am stumpfen Ende mit dem Klenow-Fragment, Ringschluß, Abbau mit KpnI, Verbinden am stumpfen Ende mit T4-Polymerase und Einbau von BamHI-Linkern, um eine BamHI-Stelle zur Verfügung zu stellen, manipuliert. Das entstandene Plasmid pCGN 1509 wurde mit BglII gespalten, am stumpfen Ende mit Klenow-Polymerase verbunden und mit HindIII-Linkern verknüpft. Das entstandene Plasmid pCGN 1510 hat eine HindIII-Stelle in der ocs-3'-Region und eine HindIII-Stelle, die benachbart und außerhalb der Tabak-ssu-Region ist. pCGN 1510 wurde dann mit BamHI und SstI abgebaut, wobei die Region zwischen der ssu-Region und der ocs-3'-Region zerschnitten wird, und ein BamHI-SstI-Fragment aus pBrx 25 so eingebaut, so daß es zwischen und in der richtigen Orientierung der ssu-Promotorregion und der ocs-3'-Endregion ist. Das entstandene 8,9 KB-Plasmid wurde mit pBrx 36 bezeichnet.

pBrx 36 wurde mit HindIII abgebaut und in mit HindIII gespaltenes pCGN 783 zu pBrx 39 und pBrx 40 eingebaut, wobei das Nitrilasegen in entgegengesetzter bzw. gleicher Transkriptionsrichtung wie das Kanamycinogen ist.

Die Plasmide wurden in *A. tumefaciens* LBA404 transformiert und dann mit zweikeimblättrigen Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. „Xanthi“) kokultiviert. Die kanamycinresistenten Schößlinge wurden in herkömmlicher Weise in Tabakpflanzen regeneriert.

Phenotyp von transgenen Tabakpflanzen, die das Bromoxynil spezifische Nitrilasegen exprimieren.

Blattgewebe aus transformierten Tabakpflanzen (5 bis 6 Blätter) exprimierten das Nitrilasegen (bestimmt nach herkömmlicher Western-Analyse). Ein 5 mm großes Blattstück aus oberflächensterilisierten (10% Hypochlorit, mit Wasser gewaschen) Blättern wurden in einem Bromoxynil enthaltenden Medium unter photoautotrophen Bedingungen suspendiert. Die verwendeten Medien waren MS-Salze, die 0,93 mg/l Naphthyllessigsäure und 0,11 mg/l Ber.zylaminopurin und unterschiedliche Mengen an

Bromoxynil enthielten. Die Bromoxynil-Konzentration schwankte von 10^{-3} bis 10^{-6} mol/l bei 0,1 Verdünnungen. Die photoautotrophen Bedingungen waren 5% CO₂, 10% O₂ und 85% N₂. Kontroll-Tabakblattabschnitte, die nicht transformiert worden sind, wurden mit 10^{-6} mol/l Bromoxynil gebleicht (gehemmt). Im Gegensatz dazu waren transformierte Blattabschnitte, die die Bromoxynil spezifische Nitrilase aus den Plasmiden pBrx39 und pBrx40 exprimierten, gegenüber 10^{-5} bzw. 10^{-4} mol/l Bromoxynil resistent.

Phenotyp von transgenen Tomatenpflanzen, die das Bromoxynil spezifische Nitrilasegen exprimieren.

Die Cokultivierung von zweikeimblättrigen Tomatenpflänzchen (*Lycopersicon esculentum* cv. UC828) wurde, wie für Tabak beschrieben, durchgeführt, Kanamycin-Schößlinge wurden regeneriert. Das Blattgewebe aus transformierten Tomatenpflanzen (7 bis 10 Blätter) exprimierten das Nitrilaseprotein (bestimmt durch Standard-Western-Analyse). Etwa 5 mm große Blattabschnitte aus oberflächensterilisierten (10% Hypochlorit, mit Wasser gewaschen) Blättern wurden in einem Bromoxynil enthaltenden Medium bei verschiedenen Konzentrationen unter photoautotrophen Bedingungen suspendiert. Die Medien waren MS-Salze, die 2 mg/l 2,4-Dichloressigsäure, 1 mg/l Isopentyladenin, 100 mg/l Myoinositol und 10^{-5} oder 10^{-6} mol/l Bromoxynil enthielten. Es wurden die gleichen photoautotrophen Bedingungen, wie oben für Tabak beschrieben, verwendet. Kontrollblattabschnitte, die nicht transformiert worden sind, wurden mit 10^{-6} mol/l Bromoxynil gebleicht, während transformierte Pflanzen, die das Bromoxynil spezifische Nitrilasegen aus pBrx29 exprimierten, gegenüber 10^{-5} mol/l Bromoxynil resistent waren. Transgene Tomatenpflanzen (10 bis 20 Blätter) wurden mit einem handelsüblichen Bromoxynilpräparat (BUCTRIL) besprüht und waren bei einer Konzentration von 0,22 kg/0,4 ha (0,5 lb/acre) resistent.

Herstellung einer modifizierten Nitrilase mit einem substituierten C-Ende

Das Plasmid pBrx9 wurde mit SphI abgebaut und wieder zum Ring geschlossen, so daß eine Deletion in der Codierregion am C-Ende des Nitrilasegens entstand. Die DNA-Sequenz aus pUC 18 ist im Leseraster mit der 3'-SphI-Stelle der Nitrilase-Codierregion, wobei etwa 10 Codons zu einem TGA-Codon aus pUC 18 zugefügt werden.

Die Anwesenheit der zusätzlichen 10 Codons ist zufällig und bestätigt die Tatsache, daß diese Codons entfernt werden können, ohne daß die Nitrilaseaktivität wesentlich beeinflusst wird, wobei eine verkürzte Nitrilase entsteht.

Im folgenden wird die Sequenz mit den vorausgesagten Aminosäuren der am C-Ende modifizierten Nitrilase (ni-11) angegeben:

92 119
 ATG GAC ACC ACT TTC AAA GCA GCC GCT GTT CAG GCC GAA CCG GTA TGG ATG GAT
 MET Asp Thr Thr Phe Lys Ala Ala Ala Val Gln Ala Glu Pro Val Trp MET Asp

146 173
 GCC GCT GCA ACA GCC GAT AAG ACC GTG ACG CTA GTA GCT AAA GCC GCA GCG GCT
 Ala Ala Ala Thr Ala Asp Lys Thr Val Thr Leu Val Ala Lys Ala Ala Ala Ala

200 227
 GGC GCG CAG CTC GTC GCA TTT CCC GAA TTG TGG ATT CCG GGC TAC CCA GGA TCC
 Gly Ala Gln Leu Val Ala Phe Pro Glu Leu Trp Ile Pro Gly Tyr Pro Gly Phe

254 281
 ATG CTC ACG CAC AAC CAA ACC GAA ACC CTA CCA TTC ATC ATT AAA TAC CGC AAG
 MET Leu Thr His Asn Gln Thr Glu Thr Leu Pro Phe Ile Ile Lys Tyr Arg Lys

308 335
 CAG GCA ATC GCC GCC GAT GGA CCA GAA ATC GAA AAA ATT CCG TGC GCG GCT CAG
 Gln Ala Ile Ala Ala Asp Gly Pro Glu Ile Glu Lys Ile Arg Cys Ala Ala Gln

362 389
 GAG CAT AAC ATT GCG CTC TCC TTT GGG TAC AGC GAA CCG GCT GGC CGT ACG CTC
 Glu His Asn Ile Ala Leu Ser Phe Gly Tyr Ser Glu Arg Ala Gly Arg Thr Leu

416 443
 TAC ATG TCA CAA ATG CTT ATC GAT GCC GAT GGC ATC ACC AAA ATT CGT CGT CGA
 Tyr MET Ser Gln MET Leu Ile Asp Ala Asp Gly Ile Thr Lys Ile Arg Arg Arg

470 497
 AAG CTC AAA CCA ACC CGC TTT GAA CGA GAA CTC TTT GGC GAA GGT GAC GGA TCG
 Lys Leu Lys Pro Thr Arg Phe Glu Arg Glu Leu Phe Gly Glu Gly Asp Gly Ser

524 551
 GAC TTA CAG GTC GCC CAA ACT AGC GTT GGT CGG GTG GGT GCC CTC AAC TCC GCG
 Asp Leu Gln Val Ala Gln Thr Ser Val Gly Arg Val Gly Ala Leu Asn Cys Ala

578 605
 GAG AAT TTG CAG TCG CTA AAC AAG TTT GCG CTT GCT GCC GAG GGT GAA CAG ATA
 Glu Asn Leu Gln Ser Leu Asn Lys Phe Ala Leu Ala Ala Glu Gly Glu Gln Ile

632 659
 CAT ATC TCC GCC TGG CCA TTC ACG CTT GGA AGC CCT GTG CTC GTC GGA GAC TCC
 His Ile Ser Ala Trp Pro Phe Thr Leu Gly Ser Pro Val Leu Val Gly Asp Ser

686 713
 ATC GGC GCC ATC AAC CAG GTC TAC GCG GCC GAG ACG GGG ACC TTC GTT CTC ATG
 Ile Gly Ala Ile Asn Gln Val Try Ala Ala Glu Thr Gly Thr Phe Val Leu MET

740 767
 TCG ACG CAG GTG GTT GGA CCG ACC GGC ATC GCC GCC TTC GAG ATC GGA GAC AGG
 Ser Thr Gln Val Val Gly Pro Thr Gly Ile Ala Ala Phe Glu Ile Glu Asp Arg

794 821
 TCA AAC CCG AAT CAG TAT CTT GGT GGT GGG TAC GCG CCG ATC TAC GGG CCT GAC
 Tyr Asn Pro Asn Gln Tyr Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp

848	875
ATG CAG TTG AAG AGC AAG TCG TTG TCA CCG ACC GAA GAG GGC ATC GTC TAC GCC	
MET Gln Leu Lys Ser Lys Ser Leu Ser Pro Thr Glu Glu Gly Ile Val Tyr Ala	
902	929
GAG ATC GAC CTG TCG ATG CTT GAG GCA GCA AAG TAC TCG CTC GAT CCC ACG GGC	
Glu Ile Asp Leu Ser MET Leu Glu Ala Ala Lys Tyr Ser Leu Asp Pro Thr Gly	
956	983
CAC TAT TCG CGC CCT GAT GTG TTC AGC GTG TCG ATT AAC CGG CAA CGG CAG CCT	
His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Phe Ser Val Ser Ile Asn Arg Gln Arg Gln Pro	
1010	1037
GCG GTG TCA GAA GTT ATC GAC TCA AAC GGT GAC GAG GAC CCG AGA GCA GCA TGC	
Ala Val Ser Glu Val Ile Asp Ser Asn Gly Asp Glu Asp Pro Arg Ala Ala Gys	
1064	1091
AAG CTT GGC ACT GGC CGT TTT ACA ACG TCG TGA CTG GGA AAA CCC TGG CGT TAC	
Lys Leu Gly Thr Gly Arg Phe Thr Thr Ser . Leu Gly Lys Pro Trp Arg Tyr	
513	540
TTA CAG GTC GCC CAA ACT AGC GTT GGT CCG GTG GGT GCC CTC AAC TGC GCG GAG	
Leu Gln Val Ala Gln Thr Ser Val Gly Arg Val Gly Ala Leu Asn Cys Ala Glu	
567	594
AAT TTG CAG TCG CTA AAC AAG TTT GCG CTT GCT GCC GAG GGT GAA CAG ATA CAT	
Asn Leu Gln Ser Leu Asn Lys Phe Ala Leu Ala Ala Glu Gly Glu Gln Ile His	
621	648
ATC TCC GCC TGG CCA TTC ACG CTT GGA AGC CCT GTG CTC GTC GGA GAC TCC ATC	
Ile Ser Ala Trp Pro Phe Thr Leu Gly Ser Pro Val Leu Val Gly Asp Ser Ile	
675	702
GGC GCC ATC AAC CAG GTC TAC GCG GCC GAG ACG GGG ACC TTC GTT CTC ATG TCG	
Gly Ala Ile Asn Gln Val Tyr Ala Ala Glu Thr Gly Thr Phe Val Leu MET Ser	
729	756
ACG CAG GTG GTT GGA CCG ACC GGC ATC GCC GCC TTC GAG ATC GAA GAC AGG TAC	
Thr Gln Val Val Gly Pro Thr Gly Ile Ala Ala Phe Glu Ile Glu Asp Arg Tyr	
783	810
AAC CCG AAT CAG TAT CTT GGT GGT GGG TAC GCG CGG ATC TAC GGG CCT GAC ATG	
Asn Pro Asn Gln Tyr Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp MET	
837	864
CAG TTG AAG AGC AAG TCG TTG TCA CCG ACC GAA GAG GGC ATC GTC TAC GCC CAG	
Gln Leu Lys Ser Lys Ser Leu Ser Pro Thy Glu Glu Gly Ile Val Tyr Ala Glu	
891	918
ATC GAC CTG TCG ATG CTT GAG GCA GCA AAG TAC TCG CTC GAT CCC ACG GGC CAC	
Ile Asp Leu Ser MET Leu Glu Ala Ala Lys Tyr Ser Leu Asp Pro Thr Gly His	
945	972
TAT TCG CGC CCT GAT GTG TTC AGC GTG TCG ATT AAC CGG CAA CGG CAG CCT GCG	
Tyr Ser Arg Pro Asp Val Phe Ser Val Ser Ile Asn Arg Gln Arg Gln Pro Ala	

999 1026
 GTG TCA GAA GTT ATC GAC TCA AAC GGT CAC GAG GAC CCG AGA GCA GCA TGC GAG
 Val Ser Glu Val Ile Asp Ser Asn Gly Asp Glu Asp Pro Arg Ala Ala Cys Glu

1053 1080
 CCC GAC GAG GGG GAT CGT GAG GTC GTA ATC TCT ACG GCA ATA GGG GTT CTA CCC
 Pro Asp Glu Gly Asp Arg Glu Val Val Ile Ser Thr Ala Ile Gly Val Leu Pro

1107 1134
 CGT TAT TGC GGA CAT TCC TAA TAA AAA GAG ACA CGT TGT ACC AAA GGG GTG TTC
 Arg Tyr Cys Gly His Ser . . Lys Glu Thr Arg Cys Thr Lys Gly Val Phe

1161 1188
 ATC TCC AGA CGC AGA AAA TAT AGC CCA GAG TTA AAA CGC GAA GCC ATC GCT TTA
 MET Ser Arg Arg Arg Lys Try Ser Pro Glu Leu Lys Arg Glu Ala Ile Ala Leu

1215

ACC CGT C
 Thr Arg His

Herstellung einer modifizierten Nitrilase mit einem substituierten N-Ende

Das Plasmid pBrx9 wurde mit BamH1 abgebaut und anschließend mit Bal31 etwa 5 min zur Entfernung von etwa 51 Nukleotiden zerschnitten. Das Enzym wurde inaktiviert, die zerschnittene lineare DNA-Sequenz wurde mit BamH1-Linkern verbunden, mit BamH1 abgebaut und unter Verknüpfungsbedingungen zum Ring geschlossen. Das entstandene Plasmid pBrx15 enthielt etwa 5,1 KB und eine geringere Anzahl an Codons am 5'-Ende. pBrx15 wurde mit HincII teilabgebaut, so daß es an der Hinc-Stelle stromabwärts von der Codierregion für die Nitrilase zerschnitten wurde, und mit BamH1 vollständig abgebaut, wobei ein Fragment entstand, in dem die Codierregion für die Nitrilase am 5'-Ende verkürzt war. Dieses Fragment wurde in pCGN566 eingebaut, das vollständig mit BamH1 und SmaI abgebaut worden war; dabei entstand das Plasmid pBrx23 mit 3,7 KB. Das Plasmid pCGN566 ist ein Derivat von pUC13 mit Polylinkern aus pUC18 und pUC19 und einem Chloramphenicol-Resistenzgen. Das Fragment aus pBrx15 wird in das Leseraster mit einem stromaufwärts gerichteten Anfangscodon eingebaut, dabei ersetzen 17 von der pUC19-Sequenz codierte Aminosäuren die Aminosäuren der natürlich vorkommenden Nitrilase. Aufgrund dieser Sequenz behält die Nitrilase ihre Aktivität sowohl mit einer längeren Aminosäuresequenz am N-Ende als auch nach Verkürzung dieser N-terminalen Sequenz oder Substitution der natürlich vorkommenden Aminosäure der N-terminalen Sequenz mit anderen Aminosäuren.

Im folgenden wird die Sequenz der N-terminal-modifizierten Nitrilase (nit-23) angegeben:

27	54
ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG TCG ACT CTA GAG GAT CCG	
MET Thr MET Ile Thr Pro Ser Leu His Ala Cys Arg Ser Thr Leu Glu Asp Pro	
81	108
GAC ACC ACT TTC AAA GCA GCC GCT GTT CAG GCC GAA CCG GTA TGG ATG GAT GCC	
Asp Thr Thr Phe Lys Ala Ala Ala Val Gln Ala Glu Pro Val Trp MET Asp Ala	
135	162
GCT GCA ACA GCT GAT AAG ACC GTG ACG CTA GTA GCT AAA GCC GCA GCG GCT GGC	
Ala Ala Thr Ala Asp Lys Thr Val Thr Leu Val Ala Lys Ala Ala Ala Ala Gly	
189	216
CGC CAG CTC GTC GCA TTT CCC GAA TTG TGG ATT CCG GGC TAC CCA GGA TTC ATG	
Ala Gln Leu Val Ala Phe Pro Glu Leu Trp Ile Pro Gly Tyr Pro Gly Phe MET	
243	270
CTC ACG CAC AAC CAA ACC GAA ACC CTA CCA TTC ATC ATT AAA TAC CGC AAG CAG	
Leu Thr His Asn Gln Thr Glu Thr Leu Pro Phe Ile Ile Lys Tyr Arg Lys Gln	
297	324
GCA ATC GCC GCC GAT CGA CCA GAA ATC GAA AAA ATT CGC TGC GCG GCT CAG GAG	
Ala Ile Ala Ala Asp Gly Pro Glu Ile Glu Lys Ile Arg Cys Ala Ala Gln Glu	
351	378
CAT AAC ATT GCG CTC TCC TTT GGG TAC AGC GAA CGG GCT GGC CGT ACG CTC TAC	
His Asn Ile Ala Leu Ser Phe Gly Tyr Ser Glu Arg Ala Gly Arg Thr Leu Tyr	
405	432
ATG TCA CAA ATG CTT ATC GAT GCC GAT GGC ATC ACC AAA ATT CGT CGT CGA AAG	
MET Ser Gln MET Leu Ile Asp Ala Asp Gly Ile Thr Lys Ile Arg Arg Arg Lys	
459	486
CTC AAA CCA ACC CGC TTT GAA CGA GAA CTC TTT GGC GAA GGT GAC GGA TCG GAC	
Leu Lys Pro Thr Arg Phe Glu Arg Glu Leu Phe Gly Glu Gly Asp Gly Ser Asp	
513	540
TTA CAG GTC GCC CAA ACT AGC GTT GGT CGG GTG GGT GCC CTC AAC TGG GCG GAG	
Leu Gln Val Ala Gln Thr Ser Val Gly Arg Val Gly Ala Leu Asn Cys Ala Glu	
567	594
AAT TTG CAG TCG CTA AAC AAG TTT GCG CTT GCT GCC GAG GGT GAA CAG ATA CAT	
Asn Leu Gln Ser Leu Asn Lys Phe Ala Leu Ala Ala Glu Gly Glu Gln Ile His	
621	648
ATC TCC GCC TGG CCA TTC ACG CTT GGA AGC CCT GTG CTC GTC GGA GAC TCC ATC	
Ile Ser Ala Trp Pro Phe Thr Leu Gly Ser Pro Val Leu Val Gly Asp Ser Ile	
675	702
GGC GCC ATC AAC CAG GTC TAC GCG GCC GAG ACG GGG ACC TTC GTT CTC ATG TCG	
Gly Ala Ile Asn Gln Val Tyr Ala Ala Glu Thr Gly Thr Phe Val Leu MET Ber	
729	756
ACG CAG GTG GTT GGA CCG ACC GGC ATC GCC GCC TTC GAG ATC GAA GAC AGG TAC	
Thr Gln Val Val Gly Pro Thr Gly Ile Ala Ala Phe Glu Ile Glu Asp Arg Tyr	
783	810
AAC CCG AAT CAG TAT CTT GGT GGT GGG TAC GCG CGG ATC TAC GGG CCT GAC ATG	
Asn Pro Asn Gln Tyr Leu Gly Gly Gly Tyr Ala Arg Ile Tyr Gly Pro Asp MET	

837	864
CAG TTG AAG AGC AAG TCG TTG TCA CCG ACC GAA GAG GGC ATC GTC TAC GCC GAG	
Gln Leu Lys Ser Lys Ser Leu Ser Pro Thr Glu Glu Gly Ile Val Tyr Ala Glu	
891	918
ATC GAC CTG TCG ATG CTT GAG GCA GCA AAG TAC TCG CTC GAT CCC ACG GGC CAC	
Ile Asp Leu Ser MET Leu Glu Ala Ala Lys Tyr Ser Leu Asp Pro Thr Gly His	
945	972
TAT TCG CGC CCT GAT GTG TTC AGC GTG TCG ATT AAC CGG CAA CGG CAG CCT GCG	
Tyr Ser Arg Pro Asp Val Phe Ser Val Ser Ile Asn Arg Gln Arg Gln Pro Ala	
999	1026
GTG TCA GAA GTT ATC GAC TCA AAC GGT GAC GAG GAC CCG AGA GCA GCA TGC GAG	
Val Ser Glu Val Ile Asp Ser Asn Gly Asp Glu Asp Pro Arg Ala Ala Cys Glu	
1053	1080
CCC GAC GAG GGG GAT CGT GAG GTC GTA ATC TCT ACG GCA ATA GGG GTT GTA CCC	
Pro Asp Glu Gly Asp Arg Glu Val Val Ile Ser Thr Ala Ile Gly Val Leu Pro	
1107	1134
CGT TAT TGC CGA CAT TCC TAA TAA AAA GAG ACA CGT TGT ACC AAA GGG GTG TTC	
Arg Tyr Cys Gly His Ser Lys Glu Thr Arg Cys Thr Lys Gly Val Phe	
1161	1188
ATG TCC AGA CGC AGA AAA TAT AGC CCA GAG TTA AAA CGC GAA GCC ATC GCT TTA	
MET Ser Arg Arg Arg Lys Tyr Ser Pro Glu Ser Lys Arg Glu Ala Ile Ala Leu	
1215	
ACC CGT C	
Thr Arg His	

Reinigung des Wildtyps und der modifizierten Nitrilase

Nitrilase wurde aus *E. coli* MM 294-Zellen in der stationären Phase, die pBrx9, pBrx11 oder pBrx28-Plasmide enthielten, erhalten. Die Kulturen wurden unter Ampicillin-Selektion gezüchtet, bis die Bestimmung auf Nitrilase in den Gesamtzellen einen OD_{640} -Wert von etwa 2,0 zeigten. Die Kulturen wurden bei 8000 g 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,1 mol/l Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 gewaschen, zu Kügelchen geformt, getrocknet und bei -20°C gefroren. Die Kügelchen wurden bei 4°C aufgetaut und in 40 ml 50 mol/l Kaliumphosphatpuffer, 1 mmol/l Dithiothreitol und 0,1 mmol/l EDTA (KDE) wieder suspendiert. Die Zellsuspension wurde durch eine französische Presse geleitet und bei 60000 g 40 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde mit KDE-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 12 mg/ml (Fraktion I) verdünnt. Der Rohextrakt wurde mit Ammoniumsulfat fraktioniert, die 25- bis 35%-Fraktion (Fraktion II) enthielt 85% der Nitrilaseaktivität. Diese Fraktion wurde in 10 ml KDE-Puffer suspendiert und ausgiebig gegen diesen Puffer dialysiert.

Die Fraktion II wurde weiter in einer DEAE-Sephadex A-50-Säule (4,9 cm² × 40 cm), die in KDE-Puffer equilibriert worden ist, gereinigt. Der Nitrilasegipfel wurde mit einem NaCl-Gradienten von 0,1 bis 0,4 mol/l in KDE-Puffer eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt (Fraktion III), mit Ammoniumsulfat ausgefällt und in 25 mmol/l Histidin, pH 6,2, dialysiert. Eine Pharmacia-Chromatofokussier-Säule (1,75 cm² × 20 cm) wurde mit Polypuffer 94 Austauschharz (PBE 94), das mit 25 mmol/l Histidin, pH 6,2, equilibriert worden ist, hergestellt. Die Säule wurde zuerst mit Polypuffer 74, pH 4,0 zur Herstellung eines pH-Gradienten von 6 bis 4 gewaschen, dann wurde das Enzym mit 1 mmol/l NaCl eluiert. Der die aktiven Enzymfraktionen enthaltende Gipfel wurde mit Ammoniumsulfat ausgefällt und in KDE (Fraktion IV) dialysiert. SDS-PAGE auf einem 11,25%igen Gel zeigte eine starke Bande bei einer Molekülmasse von etwa 37000 und eine schwache Verunreinigung bei einer Molekülmasse von etwa 70000.

Die Überprüfung mit dem Densitometer zeigt, daß das Nitrilasepräparat der Fraktion IV zu 99% homogen ist.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Reinigung und die Eigenschaften der gereinigten Nitrilaseprodukte angegeben.

Vergleich der Reinigung und der Eigenschaften des Wildtyps und der modifizierten Bromoxynil spezifischen

	Nitrilasen nit-wt	nit-11	nit-23
Ammoniumsulfat-Fraktion	25-35 %	10-25 %	20-35 %
DEAE-Sephadex-Elution	270 mmol/l	150 mmol/l	290 mmol/l
Chromatofokussierende Elution, pH 6-4-Gradient, 1 mol/l			1 mol/l
mit 1 mol/l NaCl gewaschen	NaCl	pH 4,6	NaCl
Spezifische Aktivität	25,7	55	19,7
Reinigung (x)	10,3	16,4	35,8
K _m (mol/l)	0,31	0,05	0,11
V _{max} (μmol/min/mg)	15	36	9
Aktive Enzymform	dimer	multimer	dimer

Nach den oben angegebenen Verfahren können Pflanzen erhalten werden, die Bromoxynil resistent sind und im Feld in Gegenwart von Bromoxynil verwendet werden können, ohne daß ihr Wachstum beeinträchtigt wird.

Erfindungsgemäß ist es nun möglich, die Pflanzen dadurch zu verbessern, daß sie gegenüber Herbiziden und insbesondere gegenüber spezifischen Benzonitril-Herbiziden resistent gemacht werden. Das heißt, das die Nitrilase codierende Gen kann in einen Pflanzenwirt eingeführt werden, wodurch das Gen exprimiert wird und der Pflanze Benzonitril-Resistenz verleiht.

Zusätzlich kann das Enzym durch Klonen des Gens in einen geeigneten bakteriellen Wirt, in dem das Enzym exprimiert wird, produziert werden. Enzyme mit einer zu überprüfenden Aktivität finden vielerlei Anwendungen, z. B. in Versuchen zum Nachweis bestimmter Substanzen oder des Benzonitrilsubstrats. Außerdem können die Enzyme und die die Enzyme exprimierenden Bakterien zur Entfernung der Benzonitril-Herbizide aus verunreinigten Böden eingesetzt werden.

Obwohl die Erfindung eingehend erläutert und die Beispiele zum Verständnis angegeben worden sind, können gewisse Änderungen und Modifikationen innerhalb des Schutzzumfangs der Ansprüche erfolgen.

E. coli MM 294 (pBrx5) wurde bei A.T.C.C. am 22. Januar 1986 unter der Hinterlegungsnummer 53435 hinterlegt.

E. coli MM 294 (pBrx11) wurde bei A.T.C.C. am 18. Juni 1987 unter der Hinterlegungsnummer 67441 hinterlegt.

E. coli MM 294 (pBrx23) wurde bei A.T.C.C. am 18. Juni 1987 unter der Hinterlegungsnummer 67442 hinterlegt.